

ANTIBODY AND ITS USE

Patent number: JP6317587
Publication date: 1994-11-15
Inventor: HAYASHI KYOZO
Applicant: TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD
Classification:
- International: C12N15/18; G01N33/53; C12P21/02; C12N15/16;
G01N33/53; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/18;
C12P21/02; G01N33/53; C07K15/04; C07K15/06;
C12P21/02; C12R1/91
- european:
Application number: JP19910021181 19910214
Priority number(s): JP19910021181 19910214; JP19900231317 19900831

Report a data error here

Abstract of JP6317587

PURPOSE:To provide a polyclonal antibody against human nerve growth factor (NGF) proteins.

CONSTITUTION:A polyclonal antibody is prepared from the immunogen of active human NGF proteins where a molecule contains six cysteine residues, and each pair of the cysteine residue on the first and that on the fourth from the N terminal, the second cysteine residue and the fifth one, and third cysteine residue and the sixth one makes a disulfide bond. A polyclonal antibody obtained from the antigen of this human NGF can be obtained as a mixture of various kinds of antibodies which recognize many epitopes; therefore, a trace of NGF can be measured with high sensitivity.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-317587

(43)公開日 平成6年(1994)11月15日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	B	8310-2J		
C 0 7 K 15/04		8318-4H		
15/06		8318-4H		
// C 1 2 N 15/18				
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求 未請求	請求項の数4	O L (全 35 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-21181

(22)出願日 平成3年(1991)2月14日

(31)優先権主張番号 特願平2-231317

(32)優先日 平2(1990)8月31日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 林 恭三

京都府京都市左京区下鴨泉川町38番地の18

(74)代理人 弁理士 岩田 弘

(54)【発明の名称】 抗体およびその用途

(57)【要約】

【目的】 ヒト神経成長因子 (ヒトNGF) 蛋白質に対するポリクローナル抗体を提供する。

【構成】 分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合している活性なヒトNGF蛋白質を免疫原としてポリクローナル抗体を作製した。

【効果】 本発明のヒトNGFを抗原として得たポリクローナル抗体は、多くのエピトープを認識する多種の抗体の混合物として得られ、従って、微量のNGFを高感度で測定することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合している活性なヒト神経成長因子(NGF)蛋白質を免疫原として得られるポリクローナル抗体。

【請求項2】ヒトNGF蛋白質が、ヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換され、クローン化されている動物細胞が産生したヒトNGF蛋白質である請求項1記載の抗体。

【請求項3】請求項1記載の抗体を用いることを特徴とするヒトNGF蛋白質の検出・定量法。

【請求項4】酵素免疫測定法を行なう請求項3記載の検出・定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒト神経成長因子(ヒトNGF)蛋白質を免疫原として得られるポリクローナル抗体およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】神経成長因子(nerve growth factor, NGF)はレヴィー モンタルチーニ(Levi-Montalcini)[アニュアル ニューヨーク アカデミー オブ サイエンス(Ann. N.Y. Acad. Sci.) 55, 330 (1952)]およびコーエン(Cohen)ら[プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 40, 1014 (1954)]によって発見され、末梢神経系の分化、成長および生存に必須な栄養因子である。最近、NGFは中枢神経系において、コリン作動性ニューロンの生存を維持する作用を有することが明らかにされており[ヘフティー(Heftli), ジャーナル オブ ニューロサイエンス(Journal of Neuroscience) 6, 2155 (1986); 畠中(Hatanaka)等、ディベロップメント オブ ブレイン リサーチ(Dev. Brain Res.) 39, 85 (1988)], アルツハイマー病と何らかの関連がある因子として注目されている。また、老齢ラットの脳内にNGFを投与すると、記憶障害の改善が認められる[ネイチャー(Nature), 329, 65 (1989)]ことから、老人性痴呆の治療薬としても期待されている。

【0003】雄マウス顎下腺より単離されたNGF(7SNGF)は、 α 、 β 、 γ の3種のサブユニットからなる複合体($\alpha_2\beta\gamma_2$)であり、そのうちの β サブユニットにのみNGF活性が認められている。 β サブユニット(β NGF、2.5S NGF)は118個のアミノ酸からなる同一のポリペプチドの2量体であり、そのアミノ酸配列はアルゲレッティ(Argelelli)とブラッドショウ(Bradshaw)[プロシーディングス オブ ザ ナショナル

2

アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 68, 2417 (1971)]によって決定されている。

【0004】スコット(Scott)らはマウス β NGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、マウス顎下腺cDNAライブラリーから、マウス β NGFのクローニングに成功した[ネイチャー(Nature), 302, 538 (1983)]。さらにアルリッチ(Ullrich)らはマウス β NGF cDNAをプローブとして用いて、ヒトゲノムDNAのライブラリーからNGF遺伝子をクローニングし、その塩基配列から推定したヒトNGFのアミノ酸配列がマウスNGFのそれと90%の相同性を有することを示した[ネイチャー(Nature), 303, 821 (1983)]。

【0005】

【発明が解決すべき課題】このようにヒトNGF遺伝子はクローニングされているが、生体からヒトNGFが検出・単離された報告はほとんどない。ヒトNGFが生体から検出されない理由の1つとして、今まで主として抗マウスNGF抗体を用いていたためと考えられる。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトNGFを検出・定量する目的で、組換え型ヒトNGFを免疫原として抗体を得た。得られた該抗体を用いることによってヒトNGFを検出・定量することが可能であることを見出し、さらに研究した結果、本発明を完成した。本発明は、(1)分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合している活性なヒト神経成長因子(NGF)蛋白質を免疫原として得られるポリクローナル抗体、および(2)上記(1)記載の抗体を用いることを特徴とするヒトNGF蛋白質の検出・定量法である。

【0007】本発明におけるヒトNGF蛋白質としては、ヒトNGFおよびそのムテインが挙げられる。ヒトNGFとしては胎盤由来の天然物由来のものや合成のもの、遺伝子工学的手法により製造されたものが挙げられる。ヒトNGFとしては、後述の参考例で得られた120個のアミノ酸を有するものが好ましい。該ヒトNGF蛋白質は、ヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換され、クローン化されている動物細胞が産生したヒトNGF蛋白質であることが好ましい。ヒトNGFのムテインとしては、ジスルフィド結合している分子中の6個のシステイン残基以外の、元のポリペプチドあるいは蛋白質のアミノ酸配列が変異したものが挙げられる。該変異としては、アミノ酸の付加、構成アミノ酸の欠損、他のアミノ酸への置換が挙げられる。したがって、該ムテインは上記した分子中に6個のシステ

3

イン残基を有するものである。該アミノ酸の付加としては、少なくとも1個のアミノ酸が付加しているものが挙げられる。該構成アミノ酸の欠損としては、少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が欠損しているものが挙げられる。該他のアミノ酸への置換としては、少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているものが挙げられる。ヒトNGFに少なくとも1個のアミノ酸が付加しているムテインにおける少なくとも1個のアミノ酸としては、ペプチドを発現する際に用いられる開始コドンに基因するメチオニンや、シグナルペプチドは含まれないものである。付加されているアミノ酸の数としては、少なくとも1個であるが、ヒトNGFの特徴を失わない限り何個でもよい。さらに好ましくは、ヒトNGFと相同性(ホモロジー)が認められており、同様の活性を示すタンパクのアミノ酸配列の一部あるいはすべてが挙げられる。ヒトNGFの少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が欠損しているムテインにおける欠損している構成アミノ酸の数としては、ヒトNGFの特徴を失わない限り何個でもよい。該欠損型ムテインにおけるアミノ酸の数は、41個以上であることが好ましい。

【0008】ヒトNGFの少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインにおける置換される前の少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸の数としては、ヒトNGFの特徴を失わない限り何個でもよい。置換される前の構成アミノ酸の例としては、システイン以外のものが挙げられる。置換される前の構成アミノ酸としてシステイン以外のものとしては、アスパラギン酸、アルギニン、グリシン、セリン、バリンなどが挙げられる。置換された別のアミノ酸としては、たとえば、アミノ酸の親水性、疎水性あるいは電荷の点で、置換される前のアミノ酸とは異なる性質をもつものを選ぶ。具体的には置換される前のアミノ酸がアスパラギン酸の場合には、置換されたあとのアミノ酸としてアスパラギン、スレオニン、バリン、フェニルアラニン、アルギニンなどが挙げられるが、特にアスパラギン、アルギニンが好ましい。置換される前のアミノ酸がアルギニンの場合には、置換されたあとのアミノ酸としてグルタミン、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸が挙げられるが、特にグルタミンが好ましい。置換される前の構成アミノ酸がグリシンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、セリン、グルタミン酸、アルギニンなどが挙げられ、特にスレオニンが好ましい。置換される前の構成アミノ酸がセリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、メチオニン、アラニン、ロイシン、システイン、グルタミン、アルギニン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にメチオニンが好ましい。置換される前の構成アミノ酸がバリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸とし

4

ては、セリン、ロイシン、プロリン、グリシン、リジン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にセリンが好ましい。置換されたあとのアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、スレオニン、メチオニン、セリン、ロイシンが好ましい。上記の置換においては、2以上の置換を同時に行なってもよい。該ムテインは、上記した付加、欠損、置換の2つまたは3つが組み合わさったものでもよい。

【0009】該ムテインを製造するためには、特定部位指向性変異誘発技術(Site-directed mutagenesis)が採用される。該技術は周知であり、アール・エフ・レイサー(Lather, R.F.)及びジェイ・ピー・レコック(Lecoq, J.P.), ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering)、アカデミックプレス社(1983年)第31~50頁、に示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発はエム・スミス(Smith, M.)及びエス・ギラム(Gillam, S.), ジェネティック・エンジニアリング: 原理と方法、プレナムプレス社(1981年)3巻、1~32頁、に示されている。

【0010】該ムテインをコードする構造遺伝子を製造するためには、たとえば、

(a) ヒトNGFの構造遺伝子の1本鎖からなる1本鎖DNAを突然変異株オリゴヌクレオチドプライマーと雑種形成させる(この1本鎖で代替すべきアミノ酸に対するコドン、又は場合によりこのコドンと対合をつくるアンチセンス・トリプレットを包含する領域に対して上記プライマーは相補的なものである。但し、当該コドンの他のアミノ酸暗号化用コドン、又は場合によりアンチセンス・トリプレットとの不一致はこの限りでない。)

(b) DNAポリメラーゼによりプライマーを伸長させ、突然変異性ヘテロ二量体(heteroduplex)を形成させる、及び

(c) この突然変異性ヘテロ二量体を複製する。

次に、突然変異化された遺伝子を運搬するファージDNAを単離し、プラスミドへ組み込む。このようにして得られたプラスミドで適当な宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培地に培養することにより、ムテインを製造することができる。

【0011】本発明で用いられるヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子としては、例えばヒトゲノムライブラリーからクローニングによって得られたもの、または化学合成によって得られたものなどが挙げられる。ヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子のクローニングは、例えばネイチャー(Nature), 303, 821(1983)に記載されている方法で行なうことができる。上記のようにして得られるヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子は目的によりそのまま、あるいは制限酵素で切断して使用することができる。上記で得られるヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子をプロモーターの下流に連結するが、この場合ヒトNGF蛋白質をコードするDNAの5'末端に

5

シグナルペプチドをコードするDNA、またはシグナルペプチドをコードするDNAとプロペプチドをコードするDNAを連結させることが望ましい。シグナルペプチドとしては、ヒトNGF蛋白質を分泌させることが可能なものであれば何でも良く、具体例としては、ヒト、マウス、ラット、ウシ、およびニワトリのNGFのシグナルペプチド、卵白リゾチームのシグナルペプチドおよびその変異体、ヒトインターロイキン-2のシグナルペプチドなどが挙げられる。また、プロペプチドとしては、ヒト、ラット、マウス、ウシ、およびニワトリのNGFのプロペプチドなどが挙げられる。上記の方法の他に、他の蛋白とヒトNGF蛋白質との融合蛋白として分泌生産させたのち、適当なプロテアーゼで切断することによってヒトNGF蛋白質を得ることもできる。

【0012】上記のヒトNGF蛋白質をコードするDNAなどを用いて動物細胞用のヒトNGF蛋白質発現ベクターを構築する。ヒトNGF蛋白質発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、例えばpBR322およびその誘導体、SV40系ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、レトロウイルスベクター、BKウイルスベクターなどが挙げられる。そのほかにワクシニアウイルス、EBウイルス、単純ヘルペスウイルスなどの動物ウイルスをベクターとして用いることもできる。発現ベクターに用いるプロモーターとしては、動物細胞で機能するものであればいずれでもよく、例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどが挙げられる。発現ベクターには、以上のほかに、エンハンサー、RNAスプライシングのシグナル、ポリA付加のシグナル、選択マーカーなどを用いる。発現ベクターを構築する方法自体は公知であり、例えば、モレキュラー クロニング(Molecular Cloning)、ア ラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)に記載されている。

【0013】このようにして作製したヒトNGF蛋白質発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換する。動物細胞としては、例えばサルVero細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスBALB/3T3細胞などおよびリンパ球系細胞、例えばマウスSp2/0などが挙げられる。動物細胞を形質転換する方法は公知であり、例えば、グラハム(Graham)の方法[ウィロロジー(Virology), 52, 456(1973)]などが挙げられる。以上のようにしてヒトNGF発現ベクターで形質転換された動物細胞が得られる。

【0014】上記のヒトNGF蛋白質発現ベクターで形質転換された動物細胞を用いてヒトNGF蛋白質遺伝子を安定に発現させる方法としては、ヒトNGF蛋白質発現ベクターが導入細胞の染色体に組み込まれる方法と、

6

導入細胞においてヒトNGF蛋白質発現ベクターが染色体に組み込まれることなく安定に存在させる方法がある。前者の場合には、例えばジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子などの増幅系[ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J. Mol. Biol.) 159, 601(1982)]を利用してヒトNGF蛋白質の生産量を増大させることができる。該形質転換された動物細胞は、クローン化されているものを用いるのが有利である。形質転換された動物細胞(クローン)を選択する方法自体は公知であり、例えば実験医学、臨時増刊号、Vol. 5, No. 11, 1987(羊土社)に記載されている。具体的には、ヒトNGF蛋白質遺伝子と共に選択マーカー遺伝子を指標にして形質転換株を選択する。この場合、選択マーカーをヒトNGF蛋白質遺伝子と同一ベクターに乗せて細胞に導入しても良く、また選択マーカーをこれよりも多量のヒトNGF蛋白質遺伝子とともに同一のベクターに導入せずに細胞に導入(co-transformation)しても良い。これらの選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)[メソトレキセート(MTX)耐性]、チミジンキナーゼ、Ecogpl遺伝子(ミコフェノール酸耐性)、neo遺伝子(G418耐性)などが挙げられる。さらに、このようにして選択マーカーを用いて得られた形質転換株に対し、くり返しクローン選択を行うことにより、遺伝子産物の高生産能を有する安定な細胞株を得ることができる。

【0015】このようにして得られた動物細胞を培養する際、培地としては、たとえば0.5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地[サイエンス(Science), 122, 501(1952)]、DMEM培地[ウィロロジー(Virology), 8, 396(1959)]、RPMI 1640培地[ジャーナル オブ アメリカン メディカル アソシエーション(J. Am. Med. Assoc.), 199, 519(1967), 199培地[プロシーディングス オブ ソサイエティ オブ エクスperiment バイオロジカルメディシン(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1(1950))]などが挙げられる。pHは約6~8であるのが望ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0016】本発明で用いられるヒトNGF蛋白質は細胞内または細胞外に生成、蓄積する。細胞内ヒトNGF蛋白質を培養物から抽出するに際しては、培養後公知の方法で細胞を集め、塩酸グアニジンや尿素などの蛋白変性剤を含む緩衝液やトライトンX-100などの界面活性剤を含む緩衝液中に細胞を懸濁させたのち、遠心分離によりヒトNGF蛋白質を含む上澄液を得る方法、あるいは超音波処理や凍結融解法によって細胞を破壊したのち、遠心分離によりヒトNGF蛋白質を含む上澄液を得る方法などを適宜用い得る。これらの上澄液や細胞外に生成、蓄積したヒトNGF蛋白質を分離、精製するには自体公知の分離、精製法を適切に組み合わせて実施すれ

ばよい。これらの公知の分離、精製法としては、塩析、硫酸沈澱および溶媒沈澱法などの溶解度の差を利用する方法、透析法、限外ろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、例えば抗体カラムおよび Cu^{2+} カラムなどのメタルキレートカラム、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。このようにして、活性体として、90%(w/w)以上の純度のもの、さらに好ましくは、94%(w/w)以上の純度のものが得られる。該純度は、HPLC、SDS-PAGE、生物活性から測定される。このように、ヒトNGF蛋白質の純度94%以上のものが好ましい。

【0017】このようにして得られた本発明で用いられるヒトNGF蛋白質は活性体であり、分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合しているものである。上記のようにして得られるヒトNGF蛋白質は免疫学的方法または生物活性に基づく方法で定量する。前者の例としては、パイオケミカル アンド パイオフィジカル リサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 155, 482(1988)に記載されているエンザイムイムノアッセイ(EIA)が挙げられる。後者の例としては、ニワトリ胚脊椎後根神経節(細胞成長因子、日本組織培養学会編、朝倉書店、1984年)、ラット副腎髄質由来PC12細胞【ブレイン リサーチ(Brain Research), 133, 350(1977)】などにおける神経線維の伸長、ラット中隔野コリン作動性ニューロンにおけるコリンアセチルトランスフェラーゼ活性の誘導などを指標とした生物活性測定法が挙げられる。

【0018】本発明のポリクローナル抗体を製造するためには、以上のようにして製造した免疫原を、温血動物に接種することにより行なわれる。上記抗体の製造に用いられる温血動物としては、例えば、哺乳温血動物(例、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ラット、マウス、モルモット、ウマ、ブタ)、鳥類(例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ)などが挙げられる。免疫原を、温血動物に接種する方法としては、動物に接種する免疫原は、抗体産生をすに有効な量でよく、例えば、ウサギに1回100 μg ~1mgを200 μl ~1mlの生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントで乳化して、背部ならびに後肢掌皮下に2~4週間おきに5回~7回接種すると抗体を産生させる場合が多い。このようにして、温血動物中に形成された抗体を採取する方法として

は、例えばウサギでは、通常最終接種後7日から12日の間に耳静脈から採取し、遠心分離して血清として得られる。得られた抗血清は、通常、抗原を保持させた担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーで吸着した画分を回収することによりポリクローナル抗体を精製することが出来る。

【0019】このようにして得られた抗体は、ヒトNGF蛋白質の免疫化学的測定法やWestern ブロットティングにおける試薬として用いることができる。また、この抗体は診断薬の材料としても利用できる。この抗体を用いるヒトNGFの検出・定量法は常法により行われるが、酵素免疫測定法を行なうのが好ましい。該方法としては、例えば担体上に保持された抗体、および担体上に保持された抗体とは抗原決定部位を異にする抗体に標識剤を結合させた結合物を用いてヒトNGF蛋白質を測定することができる。

【0020】ヒトNGF蛋白質の測定方法において用いられる担体上に保持された抗体における担体としては、例えば、ゲル粒子(例、アガロースゲル【例、セファロース4B、セファロース6B(ファルマシア・ファインケミカル社(スウェーデン)製)】、デキストランゲル【例、セファデックスG-75、セファデックスG-100、セファデックスG-200(ファルマシア・ファインケミカル社(スウェーデン)製)】)、ポリアクリルアミドゲル【例、パイオゲルP-30、パイオゲルP-60、パイオゲルP-100(パイオラッド・ラボラトリーズ社(米国)製)】、セルロース粒子【例、アビセル(旭化成製)、イオン交換セルロース(例、ジエチルアミノエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース)】、物理的吸着剤【例、ガラス(例、ガラス球、ガラスロッド、アミノアルキルガラス球、アミノアルキルガラスロッド)、シリコン片、スチレン系樹脂(例、ポリスチレン球、ポリスチレン粒子)、イムノアッセイ用プレート(例、ヌンク社(デンマーク)製)】、イオン交換樹脂【例、弱酸性陽イオン交換樹脂(例、アンバーライトIRC-50(ローム・アンド・ハース社(米国)製)、ゼオカーブ226(パームチット社(西ドイツ)製)】、弱塩基性陰イオン交換樹脂【例、アンバーライトIR-4B、ダウエックス3(ダウケミカル社(米国)製)】などが挙げられる。担体に抗体を保持させるには、公知の常套手段を応用し得るが、例えば、“代謝”、第8巻(1971年)、第696頁に記載されているブロムシアン法、グルタルアルデヒド法などが挙げられる。また、より簡便な方法として物理的に担体表面に吸着させてもよい。

【0021】標識剤を結合させた抗体における標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられるが、酵素を用いるのが好ましい。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等を用いることが

できるが、ペルオキシダーゼが好ましい。ペルオキシダーゼとしては、種々の起源のものをを用いることができるが、その例としてはたとえば西洋わさび、パイナップル、イチジク、甘藷、ソラマメ、トウモロコシなどから得られるペルオキシダーゼが挙げられ、特に西洋わさびから抽出されたホースラディッシュ ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) (HRP) が好ましい。ペルオキシダーゼと抗体を結合するにあたり、抗体分子としての F(ab') のチオール基を利用するために、あらかじめペルオキシダーゼにマレイミド基を導入したものをを用いると好都合である。マレイミド基をペルオキシダーゼに導入する方法としては、ペルオキシダーゼのアミノ基を介してマレイミド基を導入することができる。そのためには N-サクシニミジル-マレイミド-カルボキシレート誘導体を用いることができ、好ましくは N-(γ -マレイミドブチルオキシ)サクシニミド (GMB S と略称することもある) などが良い。従って、マレイミド基とペルオキシダーゼとの間に一定の基がはいっていることとなってもよい。GMB S をペルオキシダーゼに反応させるには、両者を pH 約 6 ないし 8 の緩衝液中で約 10 ないし 50℃ の温度で約 10 分ないし 24 時間反応させることによって行われる。該緩衝液としては、たとえば、pH 7.0 の 0.1 M リン酸緩衝液などが挙げられる。このようにして得られたマレイミド化ペルオキシダーゼは、たとえば、ゲルクロマトグラフィーなどにより精製することができる。該ゲルクロマトグラフィーを行う際に用いられる担体としては、例えば、セファデックス G-25 [ファルマシア・ファインケミカル社 (スウェーデン) 製]、バイオゲル P-2 [バイオラッド・ラボラトリーズ社 (米国) 製] などが挙げられる。

【0022】マレイミド化ペルオキシダーゼと抗体分子との反応は、両者を緩衝液中で約 0℃ ないし 40℃ の温度で、約 1 ないし 48 時間反応させることにより行うことができる。該緩衝液としては、例えば、pH 6.0 の 5 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩を含む 0.1 M リン酸緩衝液などが挙げられる。このようにして得られたペルオキシダーゼ標識抗体は、例えばゲルクロマトグラフィーなどにより精製することができる。該ゲルクロマトグラフィーを行う際に用いられる担体としては、例えば、セファデックス G-25 [ファルマシア・ファインケミカル社 (スウェーデン) 製]、バイオゲル P-2 [バイオラッド・ラボラトリーズ社 (米国) 製] などが挙げられる。さらにペルオキシダーゼにチオール基を導入し、マレイミド化された抗体分子と反応させても良い。ペルオキシダーゼ以外の酵素を抗体に直接結合させるには、ペルオキシダーゼの場合に準じて行うことができ、また、自体公知のグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、水溶性カルボジミド法などが用いられる。

【0023】本発明の測定系における被検試料としては、尿、血清、血漿、髄液等の体液、あるいは、動物細

胞や菌体の抽出液またはその培養上清が挙げられる。本発明の測定方法の例として、標識剤がペルオキシダーゼの場合について以下に具体的に説明するが、ペルオキシダーゼに限定されるものではない。

まず、①：担体に保持された抗体に測定すべきヒト NGF 含有の分析対象物を加えて抗原抗体反応を行った後、これに前記で得られたペルオキシダーゼと抗ヒト NGF 蛋白質抗体との結合物を加えて反応させる。この本測定系における被検試料としては、尿、血清、血漿、髄液等の体液、あるいは、動物細胞や菌体の抽出液またはその培養上清が挙げられる。

②：①で得られた反応生成物にペルオキシダーゼの基質を加え、生じた物質の吸光度もしくは蛍光強度を測定することにより上記の反応生成物の酵素活性を知る。

③：上記①～②の操作を既知量のヒト NGF 蛋白質の標準溶液に対してあらかじめ行い、ヒト NGF 蛋白質の吸光度もしくは蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておく。

④：未知量のヒト NGF 蛋白質を含む分析対象物 (被検試料) について得られた吸光度もしくは蛍光強度を標準曲線にあてはめ、分析対象物中のヒト NGF 蛋白質の量を測定する。

また、抗ヒト NGF 蛋白質抗体は Western ブロッティング [W.N. Burnette, アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 112, 195 (1981)] によるヒト NGF 蛋白質の検出・定量に利用することができる。

【0024】以下に Western ブロッティングの具体例を示す。ヒト NGF 蛋白質を含む試料を、例えば sample buffer [U.K. Laemmli, ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に溶解する。この場合、還元剤として 2-メルカプトエタノールを加える場合 (還元条件下) と加えない場合 (非還元条件下) があり、そのいずれでもよい。この溶液を約 100℃ で 5 分間加熱したのち、電気泳動にかける。電気泳動としては、蛋白質が分離できるものなら何でも良く、具体的には例えば SDS を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動などが挙げられる。泳動後のゲルから蛋白質をニトロセルロース膜に移す。この方法自体は公知であり、例えば、Burnette の方法 [アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 112, 195 (1981)] などが挙げられる。次にニトロセルロース膜のヒト NGF を免疫学的方法で検出する。即ち、ニトロセルロース膜を例えば 3%ゼラチン溶液でブロッキングしたのち、第 1 抗体反応を行う。第 1 抗体として用いるヒト NGF 蛋白質抗体としては抗血清でも精製したものでも良いが、精製したものの方が好ましい。ブロッキング後の第 1 抗体反応の条件としては、該膜上のヒト NGF 蛋白質が第 1 抗体と結合できる条件であれば何でも良く、例えば室温で約 4～16 時間で行う。上記の第 1 抗体反応ののち、第 2 抗体反応を行

う。用いる第2抗体としては、第1抗体と結合でき、かつ検出が可能なものであれば何でも良く、例えば、標識酵素と結合したIgGなどが挙げられる。標識酵素の具体例としては、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)、アルカリファスファターゼなどが挙げられる。第2抗体反応の条件としては第1抗体に第2抗体が結合できる条件であれば何でも良く、例えば室温で約1時間行う。上記の第2抗体反応ののち、発色を行い、ニトロセルロース膜上のヒトNGF蛋白質のバンドを検出する。上記のWestern blottingでは、約50ng以上のヒトNGF蛋白質であれば検出が可能であり、種々の量のヒトNGF蛋白質のバンドの濃さと、被検体のバンドの濃さを比較することにより、被検体中のヒトNGF蛋白質を定量することもできる。

【0025】なお、本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次にあげる。またアミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸
 A : アデニン
 C : シトニン
 G : グアニン
 T : チミン
 A, Ala : アラニン
 R, Arg : アルギニン
 N, Asn : アスパラギン
 D, Asp : アスパラギン酸
 C, Cys : システイン
 Q, Gln : グルタミン
 E, Glu : グルタミン酸
 G, Gly : グリシン
 H, His : ヒスチジン
 I, Ile : イソロイシン
 L, Leu : ロイシン
 K, Lys : リジン
 M, Met : メチオニン
 F, Phe : フェニールアラニン
 P, Pro : プロリン
 S, Ser : セリン
 T, Thr : スレオニン
 W, Trp : トリプトファン
 Y, Tyr : チロシン
 V, Val : バリン

後述の参考例6で得られた形質転換ハイブリドーマCHO-D31-10は平成1年11月15日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50217として寄託されている。また該ハイブリドーマは平成1年1

2月7日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM BP-2674として寄託されている。

【0026】

【実施例】以下に、実施例、参考例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されることはない。

参考例1 ヒトNGF発現ベクターの構築(1)

ヒト白血球DNAより作製されたλEMBL3ゲノムライブラリー[クローンテック(Clontech)社]を大腸菌NM538に感染させたのち、軟寒天プレート上に約3×10⁴クローンずつ撒いた。プラーグをナイロンメンブラン(アマシャム社、ハイボンド-N)上に移した後、0.5N NaOH-1.5M NaCl溶液に6分間浸し、ファージDNAを変性させた後、0.5M Tris-HCl(pH8.0)-1.5M NaCl溶液に6分間浸した。本メンブランを2×SSC溶液に浸し、風乾後80℃、2時間処理することによりDNAをメンブランに固定した。一方、既知[ウルリッチ(Ullrich, A.)ら、ネイチャー(Nature) 303, 821(1983)]のヒトNGF遺伝子を参考にしてヒトβNGFをコードするDNA(0.38kb)を化学合成し、これをDNAラベリングキット(ニッポンジーン社)を用いて³²Pで標識したものをプローブとした。DNAを固定したフィルターを、標識プローブを含む、6×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム), 5×Denhardt's, 0.5% SDS, 20μg/ml変性サケ精子DNA溶液中10ml中で65℃、16時間、保温した。反応後、フィルターを2×SSC, 0.1% SDS溶液中で室温で5分ずつ3回、1×SSC, 0.1% SDS溶液中で、60℃で60分洗浄した。洗浄したフィルターを乾燥させた後、ラジオオートグラムをとり、プローブと反応するクローンを検索した。この方法により得られたクローンはβLN2113よりデイヴィス(Davis)らの方法(Davisら、[アドバンスト・バクテリアル・ジェネティクス(Advanced Bacterial Genetics)], Cold Spring Harbor Laboratory 1980)によりファージDNAを抽出した。次にβLN2113をSmaIとApaIで切断し、ヒトNGF遺伝子を含むDNA(約1kb)を切り出し、プラスミドpBluescriptIIK(トローヨーボーより購入)のSmaI, ApaI部位を挿入し、プラスミドpNGFP107Gを得た。挿入された部分の塩基配列をシークナーゼ(トローヨーボー)を用いて決定した(図1~3の連続したもの)。決定された塩基配列はネイチャー(Nature), 303, 821(1983)に記載されている配列と、蛋白コード領域では完全に一致した。上記のファージβLN2113DNAを制限酵素BglIIで切断し、ヒトNGFを含むDNA断片(1.8kb)を単離した。一方、動物細胞用の発現ベクターpKSV-10(ファルマシア)を制限酵素BglIIで切断し、上記のヒトNGF遺伝子を

含むDNA断片(1.8kb)とT4DNAリガーゼで連結した。この反応液を用いてエシェリヒア コリ(*Escherichia coli*)DH1の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換体の1つ [エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*)DH1/pMNGF101] から単離したプラスミドをpMNGF101と命名した(図4)。

【0027】

参考例2 ヒトNGF発現ベクターの構築(2)

参考例1で得られたプラスミドpMNGF107Gを制限酵素BclIおよびApaIで切断し、ヒトNGF遺伝子を含むDNA断片(0.8kb)を単離した。この0.8kb BclI-ApaI断片と化学合成フダプターSN1, SN2およびSN3(図5および6参照)とを混合し、T4DNAリガーゼで連結したのち、BglIIで切断することによって0.8kb HindIII-BglIIDNA断片が得られた。プラスミドpSV2-gpt [サイエンス(Science), 209, 1422(1980)] を制限酵素EcoRIとHindIIIで切断し、SV40プロモーターを含む2.6kb EcoRI-HindIIDNA断片を単離した。次にプラスミドpMTVdhfr [ネイチャー(Nature), 294, 228(1981)] より polyA付加領域を含む1.6kb BglII-EcoRI断片を単離した。上記のSV40プロモーターを含む2.6kb EcoRI-HindIIDNA断片、ヒトNGF遺伝子を含む0.8kb HindIII-BglIIDNA断片およびpolyA付加領域を含む1.6kb BglII-EcoRI断片をT4DNAリガーゼで連結した。この反応液を用いてエシェリヒア コリ(*Escherichia coli*)DH1の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換体 [エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*)DH1/pMNGF201] から単離したプラスミドをpMNGF201と命名した。

【0028】

参考例3 ヒトNGF発現ベクターの構築(3)

参考例2で得られたプラスミドpMNGF201をHindIIIで切断し、DNAポリメラーゼ Klenowフラグメント反応により平滑化したのち、BglIIで切断して約0.8kb DNA断片を分離した。一方プラスミドpTB39(特開昭61-63282に記載)をEcoRIで切断後、Klenowフラグメント反応により平滑化したのち、BglIIで切断して約3.9kb DNA断片を得た。これら2つのDNA断片をT4DNAリガーゼ反応により環状化し、プラスミドpTB1054を得た。次に、ハムスターDHFRC DNAを有するプラスミドpTB348(特開昭61-63282に記載)をClaIで切断後アルカリ性フォスファターゼで処理し、ClaIで切断したpTB1054より分離精製された2.4kb DNA断片(MnL VLTR、ヒトNGF(hNGF)遺伝子、およびSV40 DNA由来スプライス領域、ポリ[A]付加領域を含む)と混合して、T4DNAリガーゼ反応によりヒトNGF発現ベクターpTB1058を構築した

(図7および8参照)。

【0029】参考例4 CHO細胞の形質転換

ファルコンシャーレ(直径6cm)に5%牛胎児血清を含むハム12培地を入れ、ハムスターDHFRC CHO細胞を37℃で一晩培養した。培養後、この細胞(7×10^5 個/ディッシュ)を、実施例1で得られたヒトNGF発現ベクターpTB1058(10μg)を用いてグラハムらの方法 [ウイルス学(Virology) 52: 456-467(1973)] に従って形質転換した。4時間37℃で培養後、新たな培地に代えて培養を続けた。2日後に、5%透析牛胎児血清および35μg/mlのプロリンを含むダルベッコ改変MEM培地で液替えを行って、以後この選択培地で培養を続けると約2~3週間後に、DHFRC⁺となって増殖した細胞がコロニーを形成した。

【0030】参考例5 形質転換体のクローニングおよびヒトNGF遺伝子の発現

参考例4で得た形質転換細胞のクローニングを、公知の方法(例えばリミテッド ダイリュション法)に従って行ない、形質転換体(クローン化されたもの)CHO-D5, CHO-D42およびCHO-M36を得た。クローニング終了後は、各クローン細胞を、5%牛胎児血清、35μg/mlのプロリン、50IU/mlペニシリンおよび50μg/mlストレプトマイシンを含むダルベッコ改変MEM培地にて培養した。分離された各クローンの細胞はリンプロディッシュにまき、細胞が約80%コンフルエントになった時、新しい培地と交換して、72時間培養後、培養上清中のNGFをEIA [ベーリンガー社; バイオケミカル バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 482(1988))] で定量した。ヒトNGF生産量の高いクローンを表1に示す。なお、形質転換されていないCHO細胞の培養上清にはNGFは検出されなかった。

表1

形質転換体(クローン)	NGF (ng/ml)
CHO-D5	110
CHO-D42	39
CHO-M36	24

以上の結果から、ヒトNGF遺伝子を恒久的に発現するCHO細胞は該遺伝子を一時的に発現するCOS細胞よりも多量のヒトNGFを生産することができることが明らかになった。

【0031】

参考例6 ヒトNGF高産生CHO細胞株

実施例3と同様の方法で得られた形質転換体CHO-D31を10nMメントレキセート(MTX)を含むダルベッコ改変MEM(5%牛胎児血清35μg/mlプロリンを

含む)にて培養した。このクローンは、この濃度のMTXでは正常な増殖を示したので、MTX濃度を100nMに上げて継代し培養をつづけた。更に、MTX濃度を1μMとすると大半の細胞が死滅したが、3~4日に液替を行って培養を続けると10⁶個の細胞当り数個の細胞がコロニー状に増殖をはじめた。これらの細胞が十分増殖したのち、10μM MTXの培養液にて継代すると再び大半の細胞が死滅し、数個の細胞が、コロニー状に増殖をはじめた。このようにして得られた細胞は10μM MTX存在下に、安定した正常な増殖を示し、又MTXを含まない培養液に戻して増殖させ数代継代したのち、10μM MTXに耐性のCHO-D31-10細胞(IFO 50217, FERM BP-2674)を参考例5と同じ条件で培養したところ、4mg/lのヒトNGFが培地中に生産されていることがEIAで分かった。

【0032】参考例7 ヒトNGFの単離

参考例6で得られた細胞株CHO-D31-10を5%牛胎児血清、35μg/mlプロリン、50IU/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシンおよび10μMメソトレキセートを含むダルベッコ改変培地で5%炭酸ガス中で、30℃、7日間大量に培養したところ、培地中に2.4mg/lのヒトNGFが生産されていることがEIAで分かった。培養液を遠心分離し、その培養上清2.2lにAPMSFを最終濃度0.1mMになるように添*

表2 組換え型ヒトNGFの精製の要約

	液量 (ml)	全蛋白 (mg)	全ヒトNGF (mg)	収率 (%)
培養上清	2,200	11,000	5.3	100
S-Sepharose	4.5	24	5.0	94
Sephacryl S-100	2.5	3.7	4.7	89
逆相HPLC		1.3	1.6	30

こうして得られた精製標品を16%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、銀染色を行ったところ、13キログルトン(kDa)の単一なバンドが認められた。得られた精製ヒトNGFをガラス製加水分解用試験管にとり減圧下で乾燥後、4%チオグチコール酸を含む5.7N塩酸

表3 アミノ酸組成

アミノ酸	実験値 1)	理論値 2)
Asp+Asn	13.0	13
Thr	9.7	10
Ser	9.2	11
Glu+Gln	6.6	6
Pro	2.9	3

*加し、0.2N酢酸でpH6.0に補正したのち遠心分離した。得られた上清を0.1Mリン酸緩衝液 pH6.0-1mM EDTAで平衡化させたS-Sepharose カラム(2.6cm×14cm)に吸着させ、0.1Mリン酸緩衝液pH6.0-0.15M NaCl-1mM EDTA-10%グリセロールで洗浄したのち、50mM Tris-HCl pH7.5-0.7M NaCl-1mM EDTA-10%グリセロールで溶出した。ヒトNGFを含むフラクションを集め、ダイアフローセル(タイプYM10, アミコン社)で約30倍に濃縮した。得られた濃縮液を20mM Tris-HCl pH7.4-0.5M NaCl-1mM EDTA-10%グリセロールで平衡化させたSephacryl S-100HR(200ml, 1.6cm×100cm)でゲルろ過した。ヒトNGFを含むフラクションを集めセントリプレップ10(アミコン社)で約10倍に濃縮した。得られた濃縮液を逆相HPLCにかけ、ヒトNGFを精製した。すなわち、該濃縮液をAsahipak ODP-50(10.0mmID×250mmL)カラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0-90%アセトニトリルの濃度勾配にかけ、ヒトNGFの精製標品1.2mg(アミノ酸分析より)を得た。本精製の要約を表2に示す。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および逆相HPLCの結果、得られた組換え型ヒトNGFの純度は94%であった。

【0033】

を加えて減圧下に封管したのち、110℃、24時間加水分解した。加水分解後、塩酸を除去し、残渣を0.02N塩酸に溶解してアミノ酸分析を実施した。その結果を表3に示す。

【0034】

17

18

Gly	7.3	7
Ala	6.9	7
Val	12.8	13
Met	2.1	2
Ile	6.1	6
Leu	3.2	3
Tyr	2.3	2
Phe	7.3	7
Lys	9.1	9
His	3.9	4
Arg	7.3	8
Trp	3.0	3
合 計		120

1) Asp+Asnを13として計算した。

2) ヒトNGF遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸配列から計算した。

なお, Ullrich らはマウスβNGFとの比較から、ヒトNGFが118個のアミノ酸からなると推定している
[ネイチャー(Nature), 303巻, 821頁(1983 20

年)]。精製ヒトNGFのN末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(アプライドバイオシステム社モデル470A)を用いて決定した。その結果を表4に示す。

[0035]

表4 N末端アミノ酸配列

サイクル	PTH-アミノ酸		DNAより推定されるアミノ酸配列
	Residue	p mole	
1	Ser	605	Ser
2	Ser	495	Ser
3	Ser	384	Ser
4	His	785	His
5	Pro	705	Pro
6	Ile	767	Ile
7	Phe	829	Phe
8	His	341	His
9	Arg	700	Arg
10	Gly	425	Gly
11	Glu	478	Glu
12	Phe	517	Phe
13	Ser	97	Ser
14	Val	467	Val
15	—		Cys
16	Asp	297	Asp
17	Ser	58	Ser
18	Val	392	Val
19	Ser	73	Ser
20	Val	476	Val
21	Trp	95	Trp
22	—		Val
23	Gly	166	Gly
24	Asp	179	Asp

19

25	Lys	245	Lys
26	Thr	74	Thr
27	Thr	102	Thr
28	Ala	179	Ala

20

精製ヒトNGF 2.9 nmoleを分析に用いた。

【0036】ヒドラジン分解 [Natila ら、ジャーナル オブ バイオケミストリー(J. Biochem.), 59, 170 (1966)] で調べた精製ヒトNGFのC末端アミノ酸はアラニンであった。PAG等電点電気泳動法(新版電気泳動実験法、電気泳動学会編、文光堂、1989年)で調べた結果、得られたヒトNGFの等電点はpH9-10であり、マウスNGF(Collaborative Research Incorporated)のそれとほぼ同じであった。ブレイン リサーチ(Brain Research), 133, 350 (1977), エクスペリメンタル セル リサーチ(Experimental Cell Research), 145, 179 (1983)およびジャーナル オブ ニューロサイエンス リサーチ(Journal of Neuroscience Research), 17, 25 (1987)に記載されている方法に従い、PC12細胞の神経突起の伸長 (neurite outgrowth)を指標にして、精製ヒトNGFの活性を測定したところ、精製ヒトNGFはマウス2.5S-NGFの標準品(和光純薬)と同程度の活性を示した。ディベロプメンタル バイオロジー (Developmental Biology), 111, 62 (1985)に記載されている方法に従い、ニワトリ胚の脊髄後根神経節(dorsal root ganglia; DRG)に対する精製ヒトNGFの作用を調べた。その結果、精製ヒトNGFは脊髄後根神経節(DRG)由来の神経細胞の神経突起の伸長および生存を促進した。

【0037】

参考例8 分子内ジスルフィド結合の解析

参考例7で得られた精製ヒトNGFを用いて、その分子内ジスルフィド結合の位置を決定した。凍結乾燥した精製ヒトNGF(530 μg)に0.2 mlの0.9% NaCl溶液と0.8 mlの0.01 M HClを加えて溶解した。この溶液のpHは2.2であった。これに重量比で1/50になるように、1 mg/mlのペプシン(Sigma社)溶液を1 *

* 0.6 μl加えて、37℃で22時間反応させた。反応後950 μlを採取し、50 μlの250 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)を加えて反応を停止したものをペプシン消化物とした。ペプシン消化物をHPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。TSK-ゲルODS-120Tカラム(東ソー社、0.46×25 cm)を用いて、0.05% TFA(A)および99.95%アセトニトリル0.05% TFC(B)の混合物を以下の溶出プログラムに従って流した。流速は1 ml/min, 検出波長は220 nmおよび280 nm。

時間(分)	%A	%B
0	98	2
1	87	13
35	73	27
40	40	60

一方、ペプシン消化物50 μlに100 mM DTT溶液を10 μl加え、室温で3時間放置してジスルフィド結合を還元したサンプルを同じようにHPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。これら2つのペプチドマッピングを比較することにより、ジスルフィド結合を有するペプチドを固定した後、このペプチドを単離し、気相プロテインシーケンサー末端(ABI社)アミノ酸配列を分析した。

【0038】その結果、本ペプチドは以下に示す配列-1、配列-2、および配列-3を含み、かつ3個のジスルフィド結合を持つ大きなペプチドであることがわかった。

配列-1

13 15 20
S-V-C-D-S-V-S-V

配列-2

54 58 60 65
F-E-T-K-C-R-D-P-N-P-V-D-S-G-C-R-
70 73
G-I-D-S-

配列-3

102 105 110 115
I-R-I-D-T-A-C-V-C-V-L-S-R-K-A-V-
120
R-R-A

次に、このペプチド(2060 pmol)を減圧下に濃縮乾燥した後0.3 mlの50 mM酢酸ナトリウム(pH 6.0)に溶解した。この溶液に0.48 μg(14 pmol)のサーモライ

シン(和光純薬工業(株))を加えて、37℃で20時間反応させた後、上記と同一の条件下で、HPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。ただし、以下の溶出プロ

21

22

グラムを使用した。

時間(分)	%A	%B
0	100	0
1	97	3
25	82	18
30	60	40
31	100	0

さらに、ジスルフィド結合の位置を決定するために、上記ペプチドをDITで還元処理したサンプルを同じようにHPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。ペプチドマッピングの比較から、ジスルフィド結合を含む3*

*個のフラグメント(フラグメント-1、フラグメント-2、フラグメント-3)を固定し、それぞれ取得した。フラグメント-1、フラグメント-2、およびフラグメント-3のアミノ末端アミノ酸配列を分析した。その結果を表5に示す。一方、これらのフラグメントを過ギ酸で酸化し、システイン残基をシステイン酸に変換した後、アミノ酸分析を行った結果、いずれのフラグメントにも2残基ずつのシステイン酸が検出された。

[0039]

サイ	フラグメント-1	フラグメント-2	フラグメント-3
	検出された	検出された	検出された
クル	アミノ酸(pmol)	アミノ酸(pmol)	アミノ酸(pmol)
1	Ser(60)	Phe(90)Ala(86)	Val(115)
2	Val(43)Tyr(43)	Glu(78)	Asp(70)
3	—	Thr(45)	Ser(8)
4	Asp(43)Thr(28)	Lys(62)	Gly(47)
5	Ser(17)	—	—
6		Arg(78)	Arg(27)
7		Asp(49)	Gly(24)
8		Pro(33)	
9		Asn(31)	
10		Pro(11)	
構	S ¹³ -V-C ¹⁵ -D-S ¹⁷	F ⁵⁴ -E-T-K-C ⁵⁸ -R-D-P-N-P ⁵⁹	V ⁶⁴ -D-S-G-C ⁶⁸ -R-G ⁷⁰
造	S ⁷⁸ -Y-C ⁸⁰ -T ⁸¹	A ¹⁰⁷ -C ¹⁰⁸	V ¹⁰⁹ -C ¹¹⁰

これらの結果から、精製ヒトNGFのジスルフィド結合の位置は、Cys¹³-Cys⁸⁰、Cys⁵⁸-Cys¹⁰⁸およびCys⁶⁸-Cys¹¹⁰であると結論された。このジスルフィド結合様式を図9に示す。

[0040]

実施例1 抗ヒトNGFポリクローナル抗体の作製

参考例7で得られたヒトNGFをRibi Adjuvant (RIBI Immunochem. Res. Inc.)とよく混合し、その混合物をウサギ(ニュージーランドホワイト、体重約1.5kg、雌)の背部皮下に注射した。一匹当りのヒトNGF接種量は100μgであった。以後10日毎に同量のヒトNGFとRibi Adjuvant(RIBI Immunochem. Res. Inc.)との混合物を同じウサギに5~7回注射した。上記のよう

にして免疫したウサギから採取して得られた血液を遠心分離し、抗血清を得た。得られた抗血清の抗体価をヒトNGFを抗原とするELISAで測定した結果、高い抗体価(8回; 16,000倍)が認められた。上記の抗血清をプロテインA-Sepharose カラム (Pharmacia Fine Chemicals Co., Ltd., Sweden 0.2M NaClを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したカラム(1ml)に血清を加え、同緩衝液で十分洗浄後、0.2Mを含む1%酢酸で溶出した。)により精製し、抗ヒトNGF抗体IgG画分を得た。

[0041]

実施例2 EIA法を用いたヒトNGFの定量

96ウエルのポリスチレンマイクロタイタープレート(P

alcoon Co., Ltd., USA)に実施例1で得た100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトNGF IgG画分を10 μl ずつ分注し室温で2時間置き、IgG画分をマイクロタイタープレートに付着させた。このプレートを0.4M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% NaN₃および1mM MgCl₂を含む0.1M Tris-HCl buffer(pH7.6)で、2回洗った後、同じbufferを加え(130 μl /ウエル)室温で2時間置いた。次にスタンダードヒトNGFを含む液20 μl を加え、室温で4時間ゆっくり振盪した後上記bufferで2回洗浄した。洗浄後、ビオチンラベルした抗ヒトNGF IgG液(35 ng/ml)を30 μl /ウエル加え、一晚4℃で振盪し、上記bufferで2回洗浄した。抗ヒトNGF IgG画分のビオチンラベルは HSU, S.-M., Rain e, L. and Faugen, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody(PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29(4), 577-580(1981)の方法を用いた。次に30 μl のストレプトアビシン- β -D-ガラクトシダーゼ complex を加え1時間室温で振盪した後、上記buffer で3回洗浄した。このプレートに60 mMの4-methylumbelliferyl- β -D-ガラクトシダーゼを30 μl 加え室温で4時間インキュベートし、130 μl の0.1M glycine-NaOH buffer(pH10.3)を加えて反応を停止させた後、Fluorometryにより蛍光強度(Excitation 360 nm; Emission 450 nm)を測定した。参考例7で得られたヒトNGFを用いてこのEIAを行って得た標準曲線は図10に示すようになった。この曲線から本EIAは下限1Pg/20 μl /well程度迄のヒトNGFを検出できることがわかった。

[0042]

実施例3 種々の動物由来NGFの抗原性の比較

実施例2に示された抗ヒトNGF IgG画分を用いたEIA法により、種々の動物由来NGFの抗原性を比較検討した。すなわち、実施例2と同一方法を用い、種々のNGFの標準曲線を求め、図11に示した。図11から、ウシ、モルモット、マウス、ヘビ由来NGFの順に免疫交差性が低下することが分かった。図11は、実施

例2で得られた本発明の抗ヒトNGFポリクローナル抗体を用いたEIAによる種々のNGFの標準曲線を示す。図11において—●—はヒトNGFの、—○—はウシNGFの、—△—を黒くぬった印はモルモットNGFの、—△—はマウスNGFの、—□—を黒くぬった印はヘビ(コブラ)毒NGFの結果をそれぞれ示す。

[0043]

【発明の効果】本発明ではヒトNGFを抗原として用いた抗体を得るが、ヒトNGF全蛋白質であるためこのポリクローナル抗体は多くのエピトープを認識する多種の抗体の混合物として得られる。従って本発明のヒトNGFの検出・測定法によると、微量のNGFを高感度で測定することができるので、ヒトの体液や組織中のNGFを有利に検出・測定することができ、また疾病の診断法としても用いることができる。

[0044]

【図面の簡単な説明】

【図1】、

【図2】および

【図3】は、参考例1で得られたクローン化したヒトNGF遺伝子の塩基配列およびこれから翻訳されるアミノ酸配列を示す。

【図4】は、参考例1で得られた、ヒトNGF発現ベクターpMNGF101の構築図を示す。

【図5】および

【図6】は、参考例2で得られた、ヒトNGF発現ベクターpMNGF201の構築図を示す。

【図7】および

【図8】は、参考例3で得られた、ヒトNGF発現ベクターpTB1058の構築図を示す。

【図9】は、参考例8で得られた、精製ヒトNGFのジスルフィド結合様式の解析図を示す。

【図10】は、実施例2で得られた、本発明の抗ヒトNGFポリクローナル抗体を用いたヒトNGFのEIAの標準曲線を示す。

【図11】は、実施例3で得られた、種々のNGFの標準曲線を示す。

SmaI
 CCGGGGTTACGCCCTGTTGTCCCGGTATAACCAATTGCTAGCACACCCCTTTCCCTCTCAGA
 GTTGAATGAACCTCTTCGTGATCCCCCTTGGGAGGTCAACTCTGAGGGACCCAGAAACT

AGTGCCCCCG
 GCCTTTGA CTGCATTTAGTACTCCATGAAGTCACCCCTCATTTCTTTTTCATTCAGGTG

CATAGCGTAATGTCCATGTTGTTCTACACTCTGATCAGCTTTTCTGTGATCGGCATACAG
 MetSerMetLeuPheTyrThrLeuIleThrAlaPheLeuIleGlyIleGln
 BclI

AlaGluProHisSerGluSerAsnValProAlaGlyHisThrIleProGlnValHisTrp
 GCGGAACCACTCAGAGAGCAATGTCCCTGCCAGGACACACCATCCCCCAAGTCCACTGG

ThrLysLeuGlnHisSerLeuAspThrAlaLeuArgArgAlaArgSerAlaProAlaAla
 ACTAAACTTCAGCATTTCCCTTGACACTGCCCTTCGCAGAGCCCCGACGCCGCCGAGCCG

AlaIleAlaAlaArgValAlaGlyGlnThrArgAsnIleThrValAspProArgLeuPhe
 GCGATAGCTGCACGCGTGGCGGGGACACCCGCAACATTACTGTGTGGACCCAGGCTGTTT

【図2】

LysLysArgArgLeuArgSerProArgValLeuPheSerThrGlnProProArgGluAla
 AAAAAGCGGCGACTCCGTTACCCCGTGCTGTTTAGCACCCAGCCTCCCCGTGAAGCT

AlaAspThrGlnAspLeuAspPheGluValGlyGlyAlaAlaProPheAsnArgThrHis
 GCAGACACTCAGGATCTGGACTTCGAGGTCGGTGCTGCTGCCCCCTTCAACAGGACTCAC

ArgSerLysArgSerSerHisProIlePheHisArgGlyGluPheSerValCysAsp
 AGGAGCAAGCGGTCAATCCCATCCCATCTTCCACAGGGCGGAATTCTCGGTGTGTGAC

→mature

SerValSerValTrpValGlyAspLysThrThrAlaThrAspIleLysGlyLysGluVal
 AGTGTGAGCGGTGTGGGTGGGATAAGACCAACCGCCACAGACATCAAGGGCAAGGAGGTG

MetValLeuGlyGluValAsnIleAsnAsnSerValPheLysGlnTyrPhePheGluThr
 ATGGTGTGCGGAGAGGTGAACATTAAACAACAGTGTTATTCAAACAGTACTTTTGTGAGACC

LysCysArgAspProAsnProValAspSerGlyCysArgGlyIleAspSerLysHisTrp
 AAGTGCCGGGACCCAAATCCCGTTGACAGCGGTGCCGGGCGATTGACTCAAGCACTGG

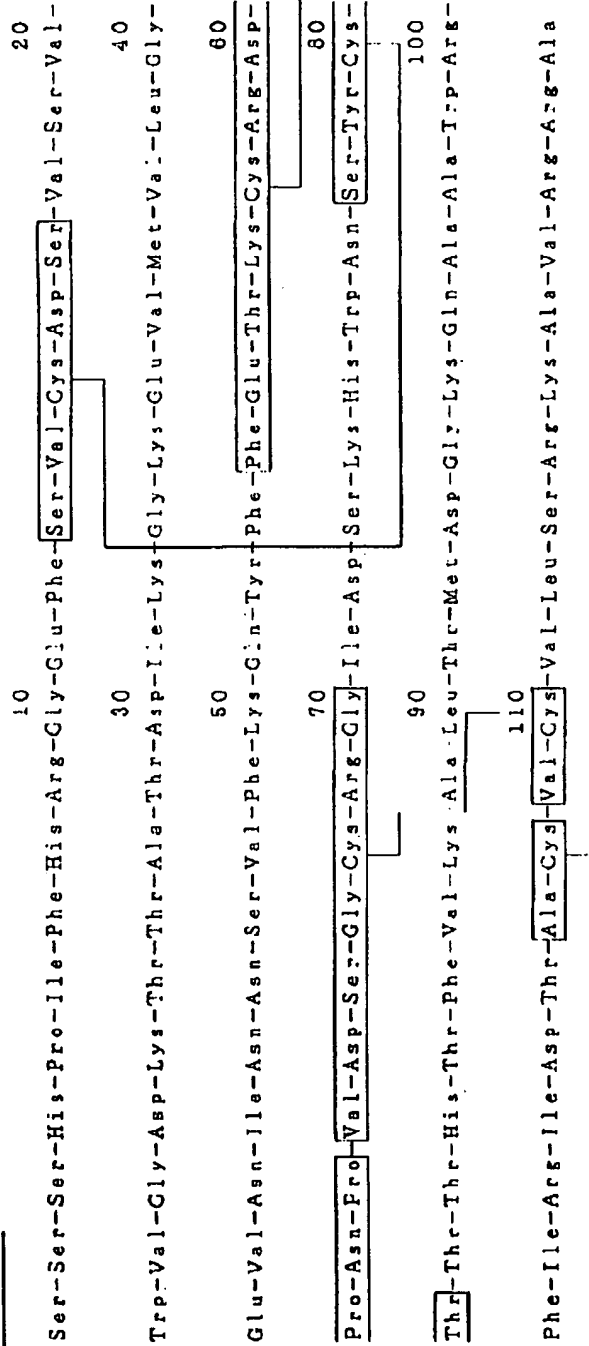
【図3】

AsnSerTyrCysThrThrHisThrPheValLysAlaLeuThrMetAspGlyLysGln
AACTCATATTGTACACGACTCACACCTTTGTCAAGCGCTGACCATGGATGGCAAGCAG

AlaAlaTrpArgPheIleArgIleAspThrAlaCysValCysValLeuSerArgLysAla
GCTGCCCTGGCGGTTTATCCGGATAGATACGGCCCTGTGTGTGTGCTCAGCAGGAAGGCT

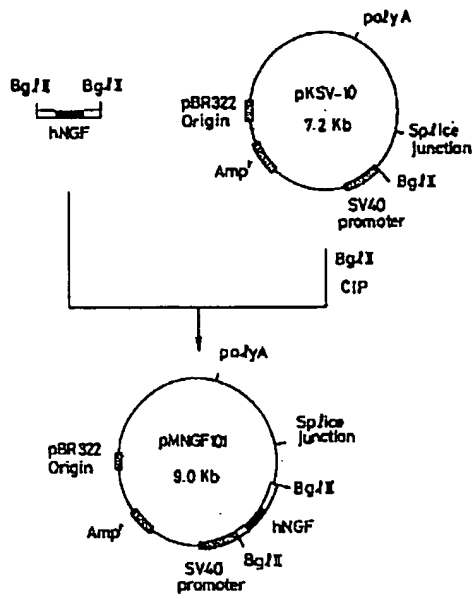
ValArgArgAla
GTGAGAAGAGCCTGACCTGCCGACACGCTCCCTCCCTGCCCCCTTCTACACTCTCC

Apal
TGGGCC

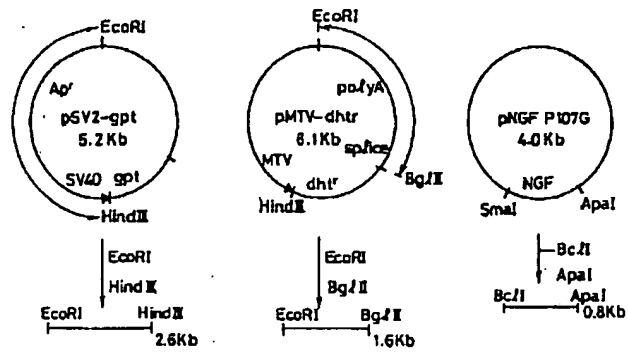


【図9】

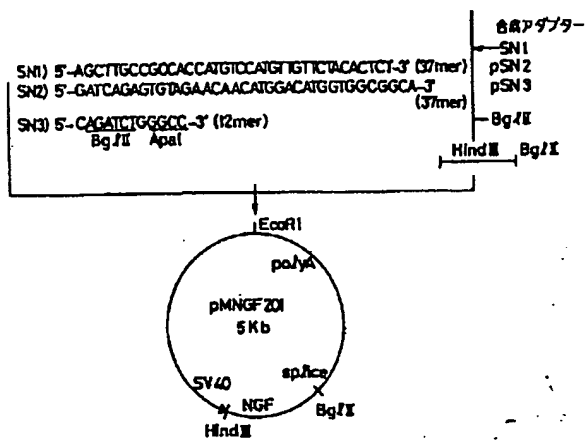
【図4】



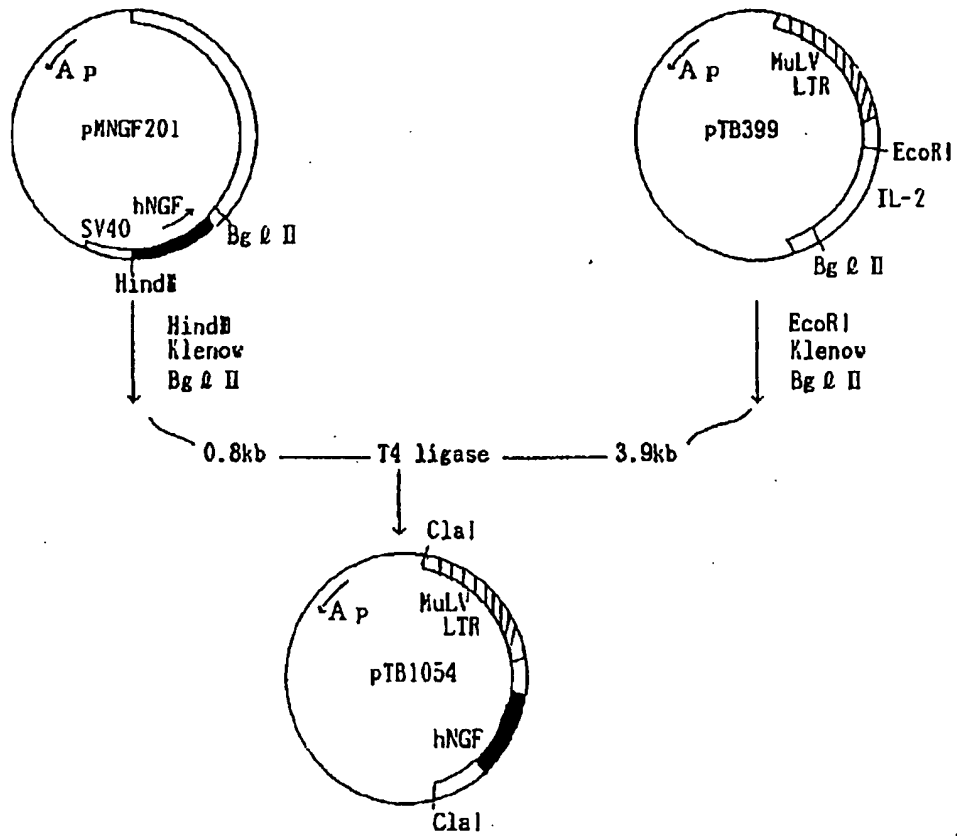
【図5】



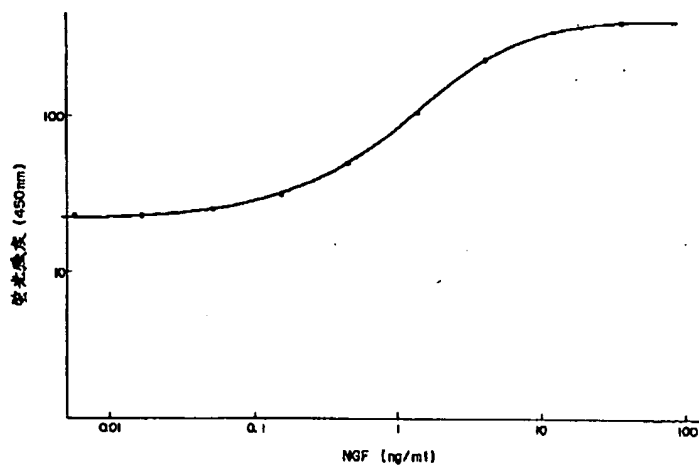
【図6】



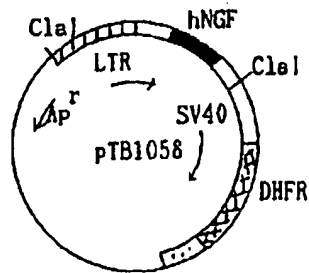
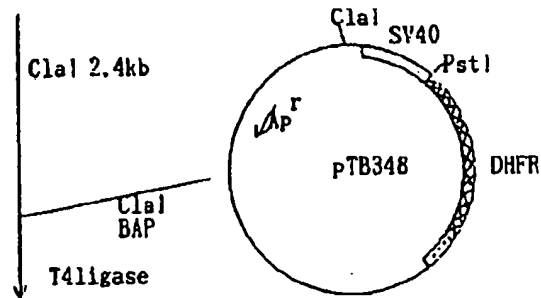
【図7】



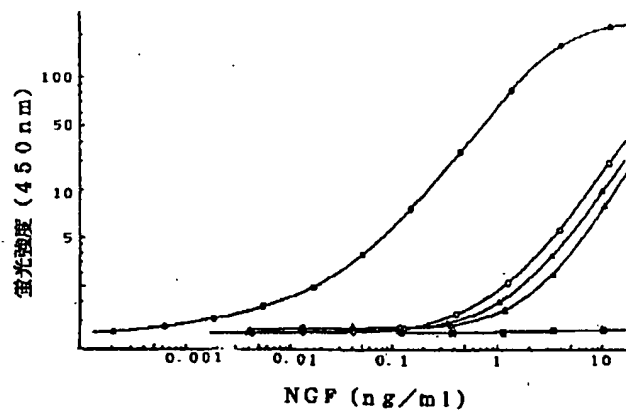
【図10】



【図8】



【図11】



【手続補正書】

【提出日】平成3年9月13日

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】抗体およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合している活性なヒト神経成長因子(NGF)蛋白質を免疫原として得られるポリクローナル抗体。

【請求項2】ヒトNGF蛋白質が、ヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換され、クローン化されている動物細胞が産生したヒトNGF蛋白質である請求項1記載の抗体。

【請求項3】請求項1記載の抗体を用いることを特徴とするヒトNGF蛋白質の検出・定量法。

【請求項4】酵素免疫測定法を行なう請求項3記載の検出・定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒト神経成長因子(ヒトNGF)蛋白質を免疫原として得られるポリクローナル抗体およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】神経成長因子(nerve growth factor, NGF)はレヴィー モンタルチーニ(Levi-Montalcini) [アニュアル ニューヨーク アカデミー オブ サイエンス(Ann. N.Y. Acad. Sci.) 55, 330 (1952)] およびコーエン(Cohen)ら [プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 40, 1014 (1954)] によって発見され、末梢神経系の分化、成長および生存に必須な栄養因子である。最近、NGFは中枢神経系において、コリン作動性ニューロンの生存を維持する作用を有することが明らかにされており(ヘフティー(Hefti), ジャーナル オブ ニューロサイエンス(Journal of Neuroscience) 6, 2155 (1986); 島中(Hatanaka)等, ディベロプメント オブ ブレイン リサーチ(Dev. Brain Res.) 39, 85 (1988)), アルツハイマー病と何らかの関連がある因子として注目されている。また、高齢ラットの脳内にNGFを投与すると、記憶障害の改善が認められる[ネイチャー(Nature), 329, 65 (1989)] ことから、老人性痴呆の治療薬としても期待されている。

【0003】雄マウス顎下腺より単離されたNGF(7SNGF)は、 α 、 β 、 γ の3種のサブユニットからなる複合体($\alpha_2\beta\gamma_2$)であり、そのうちの β サブユニットにのみNGF活性が認められている。 β サブユニット(β NGF, 2.5S NGF)は118個のアミノ酸からなる同一のポリペプチドの2量体であり、そのアミノ酸配列はアルゲレッティ(Argeletti)とブラッドショウ(Bradshaw) [プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 68, 2417 (1971)] によって決定されている。

【0004】スコット(Scott)らはマウス β NGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、マウス顎下腺cDNAライブラリーから、マウス β NGFのクローニングに成功した[ネイチャー(Nature), 302, 538 (1983)]。さらにア

ルリッチ(Ullrich)らはマウス β NGF cDNAをプローブとして用いて、ヒトゲノムDNAのライブラリーからNGF遺伝子をクローニングし、その塩基配列から推定したヒトNGFのアミノ酸配列がマウスNGFのそれと90%の相同性を有することを示した[ネイチャー(Nature), 303, 821 (1983)]。

【0005】

【発明が解決すべき課題】このようにヒトNGF遺伝子はクローニングされているが、生体からヒトNGFが検出・単離された報告はほとんどない。ヒトNGFが生体から検出されない理由の1つとして、今まで主として抗マウスNGF抗体を用いていたためと考えられる。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトNGFを検出・定量する目的で、組換え型ヒトNGFを免疫原として抗体を得た。得られた該抗体を用いることによってヒトNGFを検出・定量することが可能であることを見出し、さらに研究した結果、本発明を完成した。本発明は、(1)分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合している活性なヒト神経成長因子(NGF)蛋白質を免疫原として得られるポリクローナル抗体、および(2)上記(1)記載の抗体を用いることを特徴とするヒトNGF蛋白質の検出・定量法である。

【0007】本発明におけるヒトNGF蛋白質としては、ヒトNGFおよびそのムテインが挙げられる。ヒトNGFとしては胎盤由来の天然物由来のものや合成のもの、遺伝子工学的手法により製造されたものが挙げられる。ヒトNGFとしては、後述の参考例で得られた120個のアミノ酸を有するものが好ましい。該ヒトNGF蛋白質は、ヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換され、クローン化されている動物細胞が産生したヒトNGF蛋白質であることが好ましい。ヒトNGFのムテインとしては、ジスルフィド結合している分子中の6個のシステイン残基以外の、元のポリペプチドあるいは蛋白質のアミノ酸配列が変異したものが挙げられる。該変異としては、アミノ酸の付加、構成アミノ酸の欠損、他のアミノ酸への置換が挙げられる。したがって、該ムテインは上記した分子中に6個のシステイン残基を有するものである。該アミノ酸の付加としては、少なくとも1個のアミノ酸が付加しているものが挙げられる。該構成アミノ酸の欠損としては、少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が欠損しているものが挙げられる。該他のアミノ酸への置換としては、少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているものが挙げられる。ヒトNGFに少なくとも1個のアミノ酸が付加しているムテインにおける少なく

とも1個のアミノ酸としては、ペプチドを発現する際に用いられる開始コドンに基因するメチオニンや、シグナルペプチドは含まれないものである。付加されているアミノ酸の数としては、少なくとも1個であるが、ヒトNGFの特徴を失わない限り何個でもよい。さらに好ましくは、ヒトNGFと相同性(ホモロジー)が認められており、同様の活性を示すタンパクのアミノ酸配列の一部あるいはすべてが挙げられる。ヒトNGFの少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が欠損しているムテインにおける欠損している構成アミノ酸の数としては、ヒトNGFの特徴を失わない限り何個でもよい。該欠損型ムテインにおけるアミノ酸の数は、41個以上であることが好ましい。

【0008】ヒトNGFの少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているムテインにおける置換される前の少なくとも1個のヒトNGF構成アミノ酸の数としては、ヒトNGFの特徴を失わない限り何個でもよい。置換される前の構成アミノ酸の例としては、システイン以外のものが挙げられる。置換される前の構成アミノ酸としてシステイン以外のものとしては、アスパラギン酸、アルギニン、グリシン、セリン、バリンなどが挙げられる。置換された別のアミノ酸としては、たとえば、アミノ酸の親水性、疎水性あるいは電荷の点で、置換される前のアミノ酸とは異なる性質をもつものを選ぶ。具体的には置換される前のアミノ酸がアスパラギン酸の場合には、置換されたあとのアミノ酸としてアスパラギン、スレオニン、バリン、フェニルアラニン、アルギニンなどが挙げられるが、特にアスパラギン、アルギニンが好ましい。置換される前のアミノ酸がアルギニンの場合には、置換されたあとのアミノ酸としてグルタミン、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸が挙げられるが、特にグルタミンが好ましい。置換される前の構成アミノ酸がグリシンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、スレオニン、ロイシン、フェニルアラニン、セリン、グルタミン酸、アルギニンなどが挙げられ、特にスレオニンが好ましい。置換される前の構成アミノ酸がセリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、メチオニン、アラニン、ロイシン、システイン、グルタミン、アルギニン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にメチオニンが好ましい。置換される前の構成アミノ酸がバリンである場合には、置換されたあとのアミノ酸としては、セリン、ロイシン、プロリン、グリシン、リジン、アスパラギン酸などが挙げられ、特にセリンが好ましい。置換されたあとのアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、スレオニン、メチオニン、セリン、ロイシンが好ましい。上記の置換においては、2以上の置換を同時に行なってもよい。該ムテインは、上記した付加、欠損、置換の2つまたは3つが組み合わさったものでもよい。

【0009】該ムテインを製造するためには、特定部位指向性変異誘発技術(Site-directed mutagenesis)が採用される。該技術は周知であり、アール・エフ・レイサー(Lather, R. F.)及びジェイ・ビー・レコック(Lecoq, J. P.), ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering)、アカデミックプレス社(1983年)第31～50頁、に示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発はエム・スミス(Smith, M.)及びエス・ギラム(Gillam, S.), ジェネティック・エンジニアリング: 原理と方法、ブレナムプレス社(1981年)3巻、1～32頁、に示されている。

【0010】該ムテインをコードする構造遺伝子を製造するためには、たとえば、

(a) ヒトNGFの構造遺伝子の1本鎖からなる1本鎖DNAを突然変異株オリゴヌクレオチドプライマーと雑種形成させる(この1本鎖で代替すべきアミノ酸に対するコドン、又は場合によりこのコドンと対合をつくるアンチセンス・トリプレットを包含する領域に対して上記プライマーは相補的なものである。但し、当該コドンの他のアミノ酸暗号化用コドン、又は場合によりアンチセンス・トリプレットとの不一致はこの限りでない。)

(b) DNAポリメラーゼによりプライマーを伸長させ、突然変異性ヘテロ二量体(heteroduplex)を形成させる、及び

(c) この突然変異性ヘテロ二量体を複製する。次に、突然変異化された遺伝子を運搬するファージDNAを単離し、プラスミドへ組み込む。このようにして得られたプラスミドで適当な宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培地に培養することにより、ムテインを製造することができる。

【0011】本発明で用いられるヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子としては、例えばヒトゲノムライブラリーからクローニングによって得られたもの、または化学合成によって得られたものなどが挙げられる。ヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子のクローニングは、例えばネイチャー(Nature), 303, 821(1983)に記載されている方法で行なうことができる。上記のようにして得られるヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子は目的によりそのまま、あるいは制限酵素で切断して使用することができる。上記で得られるヒトNGF蛋白質をコードする遺伝子をプロモーターの下流に連結するが、この場合ヒトNGF蛋白質をコードするDNAの5'末端にシグナルペプチドをコードするDNA、またはシグナルペプチドをコードするDNAとプロペプチドをコードするDNAを連結させることが望ましい。シグナルペプチドとしては、ヒトNGF蛋白質を分泌させることが可能なものであれば何でも良く、具体例としては、ヒト、マウス、ラット、ウシ、およびニワトリのNGFのシグナルペプチド、卵白リゾチームのシグナルペプチドおよびその変異体、ヒトインターロイキン-2のシグナルペ

ブチドなどが挙げられる。また、プロペプチドとしては、ヒト、ラット、マウス、ウシ、およびニワトリのNGFのプロペプチドなどが挙げられる。上記の方法の他に、他の蛋白とヒトNGF蛋白質との融合蛋白として分泌生産させたのち、適当なプロテアーゼで切断することによってヒトNGF蛋白質を得ることもできる。

【0012】上記のヒトNGF蛋白質をコードするDNAなどを用いて動物細胞用のヒトNGF蛋白質発現ベクターを構築する。ヒトNGF蛋白質発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、例えばpBR322およびその誘導体、SV40系ベクター、ウシバビローマウイルスベクター、レトロウイルスベクター、BKウイルスベクターなどが挙げられる。そのほかにワクシニアウイルス、EBウイルス、単純ヘルペスウイルスなどの動物ウイルスをベクターとして用いることもできる。発現ベクターに用いるプロモーターとしては、動物細胞で機能するものであればいずれでもよく、例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどが挙げられる。発現ベクターには、以上のほかに、エンハンサー、RNAスプライシングのシグナル、ポリA付加のシグナル、選択マーカーなどを用いる。発現ベクターを構築する方法自体は公知であり、例えば、モレキュラー クロヘニング(Molecular Cloning)、ア ラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)に記載されている。

【0013】このようにして作製したヒトNGF蛋白質発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換する。動物細胞としては、例えばサルVero細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスBALB/3T3細胞などおよびリンパ球系細胞、例えばマウスSp2/0などが挙げられる。動物細胞を形質転換する方法は公知であり、例えば、グラハム(Graham)の方法(ウィロロジー(Virology), 52, 456(1973))などが挙げられる。以上のようにしてヒトNGF発現ベクターで形質転換された動物細胞が得られる。

【0014】上記のヒトNGF蛋白質発現ベクターで形質転換された動物細胞を用いてヒトNGF蛋白質遺伝子を安定に発現させる方法としては、ヒトNGF蛋白質発現ベクターが導入細胞の染色体に組み込まれる方法と、導入細胞においてヒトNGF蛋白質発現ベクターが染色体に組み込まれることなく安定に存在させる方法がある。前者の場合には、例えばジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子などの増幅系[ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J. Mol. Biol.)159, 601(1982)]を利用してヒトNGF蛋白質の生産量を増大させることができる。該形質転換された動物細胞は、クローン化されているものを用いるのが有利である。形質転

換された動物細胞(クローン)を選択する方法自体は公知であり、例えば実験医学、臨時増刊号、Vol. 5, No. 11, 1987(羊土社)に記載されている。具体的には、ヒトNGF蛋白質遺伝子と共に選択マーカー遺伝子を指標にして形質転換株を選択する。この場合、選択マーカーをヒトNGF蛋白質遺伝子と同一ベクターに乗せて細胞に導入しても良く、また選択マーカーをこれよりも多量のヒトNGF蛋白質遺伝子とともに同一のベクターに導入せずに細胞に導入(co-transformation)しても良い。これらの選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)[メソトレキセート(MTX)耐性]、チミジンキナーゼ、Ecogpt遺伝子(ミコフェノール酸耐性)、neo遺伝子(G418耐性)などが挙げられる。さらに、このようにして選択マーカーを用いて得られた形質転換株に対し、くり返しクローン選択を行うことにより、遺伝子産物の高生産能を有する安定な細胞株を得ることができる。

【0015】このようにして得られた動物細胞を培養する際、培地としては、たとえば0.5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地[サイエンス(Science), 122, 501(1952)]、DMEM培地[ウィロロジー(Virology), 8, 396(1959)]、RPMI1640培地[ジャーナル オブ アメリカン メディカル アソシエーション(J. Am. Med. Assoc.), 199, 519(1967), 199培地(プロシーディングス オブ ソサイエティ オブ エクスペリメント バイオロジカルメディシン(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1(1950)))]などが挙げられる。pHは約6~8であるのが望ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0016】本発明で用いられるヒトNGF蛋白質は細胞内または細胞外に生成、蓄積する。細胞内ヒトNGF蛋白質を培養物から抽出するに際しては、培養後公知の方法で細胞を集め、塩酸グアニジンや尿素などの蛋白変性剤を含む緩衝液やトライトンX-100などの界面活性剤を含む緩衝液中に細胞を懸濁させたのち、遠心分離によりヒトNGF蛋白質を含む上澄液を得る方法、あるいは超音波処理や凍結融解法によって細胞を破壊したのち、遠心分離によりヒトNGF蛋白質を含む上澄液を得る方法などを適宜用い得る。これらの上澄液や細胞外に生成、蓄積したヒトNGF蛋白質を分離、精製するには自体公知の分離、精製法を適切に組み合わせて実施すればよい。これらの公知の分離、精製法としては、塩析、硫酸沈殿および溶媒沈殿法などの溶解度の差を利用する方法、透析法、限外ろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、例えば抗体カラムおよびCu²⁺カラムなどのメタルキレートカラム、逆

相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。このようにして、活性体として、90%(w/w)以上の純度のもの、さらに好ましくは、94%(w/w)以上の純度のものが得られる。該純度は、HPLC、SDS-PAGE、生物活性から測定される。このように、ヒトNGF蛋白質の純度94%以上のものが好ましい。

【0017】このようにして得られた本発明で用いられるヒトNGF蛋白質は活性体であり、分子中に6個のシステイン残基を有し、N末端から数えて第1番目のシステイン残基と第4番目のシステイン残基とが、第2番目のシステイン残基と第5番目のシステイン残基とが、第3番目のシステイン残基と第6番目のシステイン残基とが、それぞれジスルフィド結合しているものである。上記のようにして得られるヒトNGF蛋白質は免疫学的方法または生物活性に基づく方法で定量する。前者の例としては、パイオケミカル アンド パイオフィジカル リサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 155, 482 (1988)に記載されているエンザイムイムノアッセイ(EIA)が挙げられる。後者の例としては、ニワトリ胚脊椎後根神経節(細胞成長因子、日本組織培養学会編、朝倉書店、1984年)、ラット副腎髄質由来PC12細胞【ブレイン リサーチ(Brain Research), 133, 350 (1977)】などにおける神経線維の伸長、ラット中隔野コリン作動性ニューロンにおけるコリンアセチルトランスフェラーゼ活性の誘導などを指標とした生物活性測定法が挙げられる。

【0018】本発明のポリクローナル抗体を製造するためには、以上のようにして製造した免疫原を、温血動物に接種することにより行なわれる。上記抗体の製造に用いられる温血動物としては、例えば、哺乳温血動物(例、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ラット、マウス、モルモット、ウマ、ブタ)、鳥類(例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ)などが挙げられる。免疫原を、温血動物に接種する方法としては、動物に接種する免疫原は、抗体産生をするに有効な量でよく、例えば、ウサギに1回100 μ g~1mgを200 μ l~1mlの生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントで乳化して、背部ならびに後肢掌皮下に2~4週間おきに5回~7回接種すると抗体を産生させる場合が多い。このようにして、温血動物中に形成された抗体を採取する方法としては、例えばウサギでは、通常最終接種後7日から12日の間に耳静脈から採取し、遠心分離して血清として得られる。得られた抗血清は、通常、抗原を保持させた担体を用いるアフィニティクロマトグラフィーで吸着した画分を回収することによりポリクローナル抗体を精製することが出来る。

【0019】このようにして得られた抗体は、ヒトNGF蛋白質の免疫化学的測定法やWestern ブロットティング

における試薬として用いることができる。また、この抗体は診断薬の材料としても利用できる。この抗体を用いるヒトNGFの検出・定量法は常法により行われるが、酵素免疫測定法を行なうのが好ましい。該方法としては、例えば担体上に保持された抗体、および担体上に保持された抗体とは抗原決定部位を異にする抗体に標識剤を結合させた結合物を用いてヒトNGF蛋白質を測定することができる。

【0020】ヒトNGF蛋白質の測定方法において用いられる担体上に保持された抗体における担体としては、例えば、ゲル粒子(例、アガロースゲル【例、セファロース4B、セファロース6B(ファルマシア・ファインケミカル社(スエーデン)製)】、デキストランゲル【例、セファデックスG-75、セファデックスG-100、セファデックスG-200(ファルマシア・ファインケミカル社(スエーデン)製)】)、ポリアクリルアミドゲル【例、バイオゲルP-30、バイオゲルP-60、バイオゲルP-100(パイオラッド・ラボラトリーズ社(米国)製)】、セルロース粒子【例、アビセル(旭化成製)、イオン交換セルロース(例、ジエチルアミノエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース)】、物理的吸着剤【例、ガラス(例、ガラス球、ガラスロッド、アミノアルキルガラス球、アミノアルキルガラスロッド)、シリコン片、スチレン系樹脂(例、ポリスチレン球、ポリスチレン粒子)、イムノアッセイ用プレート(例、ヌンク社(デンマーク)製)】、イオン交換樹脂【例、弱酸性陽イオン交換樹脂【例、アンバーライトIRC-50(ローム・アンド・ハース社(米国)製)、ゼオカーブ226(バウムチット社(西ドイツ)製)】、弱塩基性陰イオン交換樹脂【例、アンバーライトIR-4B、ダウエックス3(ダウケミカル社(米国)製)】】などが挙げられる。担体に抗体を保持させるには、公知の常套手段を応用し得るが、例えば、“代謝”、第8巻(1971年)、第696頁に記載されているブロムシアン法、グルタルアルデヒド法などが挙げられる。また、より簡便な方法として物理的に担体表面に吸着させてもよい。

【0021】標識剤を結合させた抗体における標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられるが、酵素を用いるのが好ましい。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等を用いることができるが、ペルオキシダーゼが好ましい。ペルオキシダーゼとしては、種々の起源のものを用いることができるが、その例としてはたとえば西洋わさび、パイナップル、イチジク、甘藷、ソラマメ、トウモロコシなどから得られるペルオキシダーゼが挙げられ、特に西洋わさびから抽出されたホースラディッシュ ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)(HRP)が好ましい。ペルオキシダーゼと抗体を結合するにあたり、抗体分子として

のFab'のチオール基を利用するために、あらかじめペルオキシダーゼにマレイミド基を導入したものを用いると好都合である。マレイミド基をペルオキシダーゼに導入する方法としては、ペルオキシダーゼのアミノ基を介してマレイミド基を導入することができる。そのためにはN-サクシニミジル-マレイミド-カルボキシレート誘導体を用いることができ、好ましくはN-(γ -マレイミドブチルオキシ)サクシイミド(GMBSと略称することもある)などが良い。従って、マレイミド基とペルオキシダーゼとの間に一定の基がはいっていることとなってもよい。GMBSをペルオキシダーゼに反応させるには、両者をpH約6ないし8の緩衝液中で約10ないし50℃の温度で約10分ないし24時間反応させることによって行われる。該緩衝液としては、たとえば、pH7.0の0.1Mリン酸緩衝液などが挙げられる。このようにして得られたマレイミド化ペルオキシダーゼは、たとえば、ゲルクロマトグラフィーなどにより精製することができる。該ゲルクロマトグラフィーを行う際に用いられる担体としては、例えば、セファデックスG-25〔ファルマシア・ファインケミカル社(スウェーデン)製〕、バイオゲルP-2〔パイオラッド・ラボラトリーズ社(米国)製〕などが挙げられる。

【0022】マレイミド化ペルオキシダーゼと抗体分子との反応は、両者を緩衝液中で約0℃ないし40℃の温度で、約1ないし48時間反応させることにより行うことができる。該緩衝液としては、例えば、pH6.0の5mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩を含む0.1Mリン酸緩衝液などが挙げられる。このようにして得られたペルオキシダーゼ標識抗体は、例えばゲルクロマトグラフィーなどにより精製することができる。該ゲルクロマトグラフィーを行う際に用いられる担体としては、例えば、セファデックスG-25〔ファルマシア・ファインケミカル社(スウェーデン)製〕、バイオゲルP-2〔パイオラッド・ラボラトリーズ社(米国)製〕などが挙げられる。さらにペルオキシダーゼにチオール基を導入し、マレイミド化された抗体分子と反応させても良い。ペルオキシダーゼ以外の酵素を抗体に直接結合させるには、ペルオキシダーゼの場合に準じて行うことができ、また、自体公知のグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、水溶性カルボジイミド法などが用いられる。

【0023】本発明の測定系における被検試料としては、尿、血清、血漿、髄液等の体液、あるいは、動物細胞や菌体の抽出液またはその培養上清が挙げられる。本発明の測定方法の例として、標識剤がペルオキシダーゼの場合について以下に具体的に説明するが、ペルオキシダーゼに限定されるものではない。

まず、①：担体に保持された抗体に測定すべきヒトNGF含有の分析対象物を加えて抗原抗体反応を行った後、これに前記で得られたペルオキシダーゼと抗ヒトNGF蛋白質抗体との結合物を加えて反応させる。この本測定

系における被検試料としては、尿、血清、血漿、髄液等の体液、あるいは、動物細胞や菌体の抽出液またはその培養上清が挙げられる。

②：①で得られた反応生成物にペルオキシダーゼの基質を加え、生じた物質の吸光度もしくは蛍光強度を測定することにより上記の反応生成物の酵素活性を知る。

③：上記①～②の操作を既知量のヒトNGF蛋白質の標準溶液に対してあらかじめ行い、ヒトNGF蛋白質の吸光度もしくは蛍光強度との関係を標準曲線として作成しておく。

④：未知量のヒトNGF蛋白質を含む分析対象物(被検試料)について得られた吸光度もしくは蛍光強度を標準曲線にあてはめ、分析対象物中のヒトNGF蛋白質の量を測定する。

また、抗ヒトNGF蛋白質抗体はWesternブロッティング〔W.N.Burnette, アナリティカルバイオケミストリー(A analytical Biochemistry), 112, 195(1981)〕によるヒトNGF蛋白質の検出・定量に利用することができる。

【0024】以下にWesternブロッティングの具体例を示す。ヒトNGF蛋白質を含む試料を、例えばsample buffer〔U.K.Laemmli, ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)〕に溶解する。この場合、還元剤として2-メルカプトエタノールを加える場合(還元条件下)と加えない場合(非還元条件下)があり、そのいずれでもよい。この溶液を約100℃で5分間加熱したのち、電気泳動にかけ、電気泳動としては、蛋白質が分離できるものなら何でも良く、具体的には例えばSDSを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動などが挙げられる。泳動後のゲルから蛋白質をニトロセルロース膜に移す。この方法自体は公知であり、例えば、Burnetteの方法〔アナリティカルバイオケミストリー(A analytical Biochemistry), 112, 195(1981)〕などが挙げられる。次にニトロセルロース膜のヒトNGFを免疫学的方法で検出する。即ち、ニトロセルロース膜を例えば3%ゼラチン溶液でブロッキングしたのち、第1抗体反応を行う。第1抗体として用いるヒトNGF蛋白質抗体としては抗血清でも精製したものでも良いが、精製したものの方が好ましい。ブロッキング後の第1抗体反応の条件としては、該膜上のヒトNGF蛋白質が第1抗体と結合できる条件であれば何でも良く、例えば室温で約4～16時間で行う。上記の第1抗体反応ののち、第2抗体反応を行う。用いる第2抗体としては、第1抗体と結合でき、かつ検出が可能なものであれば何でも良く、例えば、標識酵素と結合したIgGなどが挙げられる。標識酵素の具体例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリファスファターゼなどが挙げられる。第2抗体反応の条件としては第1抗体に第2抗体が結合できる条件であれば何でも良く、例えば室温で約1時間行う。上記の第2抗体反応ののち、発色を行い、ニトロ

セルロース膜上のヒトNGF蛋白質のバンドを検出する。上記のWestern blottingでは、約50ng以上のヒトNGF蛋白質であれば検出が可能であり、種々の量のヒトNGF蛋白質のバンドの濃さと、被検体のバンドの濃さを比較することにより、被検体中のヒトNGF蛋白質を定量することもできる。

【0025】なお、本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次にあげる。またアミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

A : アデニン

C : シトシン

G : グアニン

T : チミン

A, Ala : アラニン

R, Arg : アルギニン

N, Asn : アスパラギン

D, Asp : アスパラギン酸

C, Cys : システイン

Q, Gln : グルタミン

E, Glu : グルタミン酸

G, Gly : グリシン

H, His : ヒスチジン

I, Ile : イソロイシン

L, Leu : ロイシン

K, Lys : リジン

M, Met : メチオニン

F, Phe : フェニルアラニン

P, Pro : プロリン

S, Ser : セリン

T, Thr : スレオニン

W, Trp : トリプトファン

Y, Tyr : チロシン

V, Val : バリン

後述の参考例6で得られた形質転換ハイブリドーマCHO-D31-10は平成1年11月15日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50217として寄託されている。また該ハイブリドーマは平成1年12月7日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM BP-2674として寄託されている。

【0026】

【実施例】以下に、実施例、参考例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されることはない。

参考例1 ヒトNGF発現ベクターの構築(1)

ヒト白血球DNAより作製されたλEMBL3ゲノムライブラリー(クローンテック(Clontech)社)を大腸菌NM538に感染させたのち、軟寒天プレート上に約3×10⁴クローンずつ撒いた。プラーグをナイロンメンブラン(アマシャム社、ハイボンド-N)上に移した後、0.5N NaOH-1.5M NaCl溶液に6分間浸し、ファージDNAを変性させた後、0.5M Tris-HCl(pH8.0)-1.5M NaCl溶液に6分間浸した。本メンブランを2×SSC溶液に浸し、風乾後80℃、2時間処理することによりDNAをメンブランに固定した。一方、既知[ウルリッチ(Ullrich, A.)ら、ネイチャー(Nature) 303, 821(1983)]のヒトNGF遺伝子を参考にしてヒトβNGFをコードするDNA(0.38kb)を化学合成し、これをDNAラベリングキット(ニッポンジーン社)を用いて³²Pで標識したものをプローブとした。DNAを固定したフィルターを、標識プローブを含む、6×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム), 5×Denhardt's, 0.5% SDS, 20μg/ml変性サケ精子DNA溶液中10ml中で65℃、16時間、保温した。反応後、フィルターを2×SSC, 0.1% SDS溶液中で室温で5分ずつ3回、1×SSC, 0.1% SDS溶液中で、60℃で60分洗浄した。洗浄したフィルターを乾燥させた後、ラジオオートグラムをとり、プローブと反応するクローンを検索した。この方法により得られたクローンλβLN2113よりデイヴィス(Davis)らの方法(Davisら、[アドバンスト・バクテリアル・ジェネティクス(Advanced Bacterial Genetics)], Cold Spring Harbor Laboratory 1980)によりファージDNAを抽出した。次にλβLN2113をSmaIとApaIで切断し、ヒトNGF遺伝子を含むDNA(約1kb)を切り出し、プラスミドpBluescript I I K(トーヨーボーより購入)のSmaI, ApaI部位を挿入し、プラスミドpNGFP107Gを得た。挿入された部分の塩基配列をシークナーゼ(トーヨーボー)を用いて決定した[図1]~[図3]の連続したもの(配列表: 配列番号1)。決定された塩基配列はネイチャー(Nature), 303, 821(1983)に記載されている配列と、蛋白コード領域では完全に一致した。上記のファージλβLN2113DNAを制限酵素BglIIで切断し、ヒトNGFを含むDNA断片(1.8kb)を単離した。一方、動物細胞用の発現ベクターpKSV-10(ファルマシア)を制限酵素BglIIで切断し、上記のヒトNGF遺伝子を含むDNA断片(1.8kb)とT4DNAリガーゼで連結した。この反応液を用いてエシェリヒア コリ(Escherichia coli)DH1の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換体の1つ[エシェリヒア コリ(Escherichia coli)DH1/pMNGF101]から単離したプラスミドをpMNGF101と命名した[図4]。

【0027】

参考例2 ヒトNGF発現ベクターの構築(2)

参考例1で得られたプラスミドpNGF107Gを制限酵素Bcl IおよびApa Iで切断し、ヒトNGF遺伝子を含むDNA断片(0.8kb)を単離した。この0.8kb Bcl I-Apa I断片と化学合成フダプターSN1 (配列表: 配列番号2)、SN2 (配列表: 配列番号3) およびSN3 (配列表: 配列番号4) (図5) および (図6) 参照)とを混合し、T4DNAリガーゼで連結したのち、Bgl IIで切断することによって0.8 kb Hind III-Bgl IIDNA断片が得られた。プラスミドpSV2-gpt (サイエンス(Science), 209, 1422 (1980)) を制限酵素EcoRIとHindIIIで切断し、SV40プロモーターを含む2.6kb EcoRI-Hind IIDNA断片を単離した。次にプラスミドpMTVdhfr [ネイチャー(Nature), 294, 228 (1981)] より polyA付加領域を含む1.6kb Bgl II-EcoRI断片を単離した。上記のSV40プロモーターを含む2.6kb EcoRI-Hind IIDNA断片、ヒトNGF遺伝子を含む0.8kb Hind III-Bgl IIDNA断片およびpolyA付加領域を含む1.6kb Bgl II-EcoRI断片をT4DNAリガーゼで連結した。この反応液を用いてエシェリヒア コリ(Escherichia coli) DH1の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換体 [エシェリヒア コリ(Escherichia coli) DH1/pMNGF201] から単離したプラスミドをpMNGF201と命名した。

【0028】

参考例3 ヒトNGF発現ベクターの構築(3)

参考例2で得られたプラスミドpMNGF201をHind IIIで切断し、DNAポリメラーゼ Klenowフラグメント反応により平滑化したのち、Bgl IIで切断して約0.8kb DNA断片を分離した。一方プラスミドpTB39 (特開昭61-63282に記載)をEcoRIで切断後、Klenowフラグメント反応により平滑化したのち、Bgl IIで切断して約3.9kb DNA断片を得た。これら2つのDNA断片をT4DNAリガーゼ反応により環状化し、プラスミドpTB1054を得た。次に、ハムスターDHFRcDNAを有するプラスミドpTB348 (特開昭61-63282に記載)をCla Iで切断後アルカリ性フォスファターゼで処理し、Cla Iで切断したpTB1054より分離精製された2.4kb DNA断片(MnL VLTR、ヒトNGF(hNGF)遺伝子、およびSV40DNA由来スプライス領域、ポリ(A)付加領域を含む)と混合して、T4DNAリガーゼ反応によりヒトNGF発現ベクターpTB1058を構築した(図7および8参照)。

【0029】参考例4 CHO細胞の形質転換

ファルコンシャーレ(直径6cm)に5%牛胎児血清を含むハム12培地を入れ、ハムスターDHFR⁻CHO細胞を37℃で一晩培養した。培養後、この細胞(7×10⁵個/ディッシュ)を、実施例1で得られたヒトNGF発

現ベクターpTB1058(10μg)を用いてグラハムらの方法 [ウイルス学(Virology) 52: 456-467 (1973)] に従って形質転換した。4時間37℃で培養後、新たな培地に代えて培養を続けた。2日後に、5%透析牛胎児血清および35μg/mlのプロリンを含むダルベッコ改変MEM培地で液替えを行って、以後この選択培地で培養を続けると約2~3週間後に、DHFR⁺となって増殖した細胞がコロニーを形成した。

【0030】参考例5 形質転換体のクローニングおよびヒトNGF遺伝子の発現

参考例4で得た形質転換細胞のクローニングを、公知の方法(例えばリミテッド ダイリューション法)に従って行ない、形質転換体(クローン化されたもの)CHO-D5、CHO-D42およびCHO-M36を得た。クローニング終了後は、各クローン細胞を、5%牛胎児血清、35μg/mlのプロリン、50IU/mlペニシリンおよび50μg/mlストレプトマイシンを含むダルベッコ改変MEM培地にて培養した。分離された各クローンの細胞はリンプロディッシュにまき、細胞が約80%コンフルエントになった時、新しい培地と交換して、72時間培養後、培養上清中のNGFをEIA [ベアリンガー社; バイオケミカル バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 482 (1988))] で定量した。ヒトNGF生産量の高いクローンを表1に示す。なお、形質転換されていないCHO細胞の培養上清にはNGFは検出されなかった。

表1

形質転換体(クローン)	NGF (ng/ml)
CHO-D5	110
CHO-D42	39
CHO-M36	24

以上の結果から、ヒトNGF遺伝子を恒久的に発現するCHO細胞は該遺伝子を一時的に発現するCOS細胞よりも多量のヒトNGFを生産することができることが明らかになった。

【0031】

参考例6 ヒトNGF高産生CHO細胞株

実施例3と同様の方法で得られた形質転換体CHO-D31を10nMメントレキセート(MTX)を含むダルベッコ改変MEM(5%牛胎児血清35μg/mlプロリンを含む)にて培養した。このクローンは、この濃度のMTXでは正常な増殖を示したので、MTX濃度を100nMに上げて継代し培養をつづけた。更に、MTX濃度を1μMとすると大半の細胞が死滅したが、3~4日に液替を行って培養を続けると10⁵個の細胞当たり数個の細胞がコロニー状に増殖をはじめた。これらの細胞が十

分増殖したのち、 $10\mu\text{M}$ MTXの培養液にて継代すると再び大半の細胞が死滅し、数個の細胞が、コロニー状に増殖をはじめた。このようにして得られた細胞は $10\mu\text{M}$ MTX存在下に、安定した正常な増殖を示し、又MTXを含まない培養液に戻して増殖させ数代継代したのち、 $10\mu\text{M}$ MTX存在下に培養しても正常に増殖した。この $10\mu\text{M}$ MTXに耐性のCHO-D31-10細胞(IFO 50217, FERM BP-2674)を参考例5と同じ条件で培養したところ、 4mg/l のヒトNGFが培地中に生産されていることがEIAで分かった。

【0032】参考例7 ヒトNGFの単離

参考例6で得られた細胞株CHO-D31-10を5%牛胎児血清、 $35\mu\text{g/ml}$ プロリン、 50IU/ml ペニシリン、 $50\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンおよび $10\mu\text{M}$ メソトレキセートを含むダルベッコ改変培地で5%炭酸ガス中で、 30°C 、7日間大量に培養したところ、培地中に 2.4mg/l のヒトNGFが生産されていることがEIAで分かった。培養液を遠心分離し、その培養上清2.2lにAPMSFを最終濃度 0.1mM になるように添加し、 0.2N 酢酸で $\text{pH}6.0$ に補正したのち遠心分離した。得られた上清を 0.1M リン酸緩衝液 $\text{pH}6.0$ - 1mM EDTAで平衡化させたS-Sepharose カラ*

* $\Delta(2.6\text{cm} \times 14\text{cm})$ に吸着させ、 0.1M リン酸緩衝液 $\text{pH}6.0$ - 0.15M NaCl - 1mM EDTA - 10% グリセロールで洗浄したのち、 50mM Tris-HCl $\text{pH}7.5$ - 0.7M NaCl - 1mM EDTA - 10% グリセロールで溶出した。ヒトNGFを含むフラクションを集め、ダイアフローセル(タイプYM10, アミコン社)で約30倍に濃縮した。得られた濃縮液を 20mM Tris-HCl $\text{pH}7.4$ - 0.5M NaCl - 1mM EDTA - 10% グリセロールで平衡化させたSepharacryl S-100HR(200ml , $1.6\text{cm} \times 100\text{cm}$)でゲルろ過した。ヒトNGFを含むフラクションを集めセントリプレップ10(アミコン社)で約10倍に濃縮した。得られた濃縮液を逆相HPLCにかけ、ヒトNGFを精製した。すなわち、該濃縮液をAsahipak ODP-50($10.0\text{mmID} \times 250\text{mmL}$)カラムにかけ、 0.1% トリフルオロ酢酸を含む $0-90\%$ アセトニトリルの濃度勾配にかけ、ヒトNGFの精製標品 1.2mg (アミノ酸分析より)を得た。本精製の要約を表2に示す。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および逆相HPLCの結果、得られた組換え型ヒトNGFの純度は94%であった。

【0033】

表2 組換え型ヒトNGFの精製の要約

	液量 (ml)	全蛋白 (mg)	全ヒトNGF (mg)	収率 (%)
培養上清	2,200	11,000	5.3	100
S-Sepharose	4.5	24	5.0	94
Sepharacryl S-100	2.5	3.7	4.7	89
逆相HPLC		1.3	1.6	30

こうして得られた精製標品を 16% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、銀染色を行ったところ、 13kDa の単一なバンドが認められた。得られた精製ヒトNGFをガラス製加水分解用試験管にとり減圧下で乾燥後、 4% チオグチコール酸を含む 5.7N 塩酸

を加えて減圧下に封管したのち、 110°C 、24時間加水分解した。加水分解後、塩酸を除去し、残渣を 0.02N 塩酸に溶解してアミノ酸分析を実施した。その結果を表3に示す。

【0034】

表3 アミノ酸組成

アミノ酸	実験値 1)	理論値 2)
Asp+Asn	13.0	13
Thr	9.7	10
Ser	9.2	11
Glu+Gln	6.6	6
Pro	2.9	3
Gly	7.3	7
Ala	6.9	7
Val	12.8	13

Met	2.1	2
Ile	6.1	6
Leu	3.2	3
Tyr	2.3	2
Phe	7.3	7
Lys	9.1	9
His	3.9	4
Arg	7.3	8
Trp	3.0	3
合 計		120

1) Asp+Asnを13として計算した。

2) ヒトNGF遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸配列から計算した。

なお、Ullrich らはマウスβNGFとの比較から、ヒトNGFが118個のアミノ酸からなると推定している〔ネイチャー(Nature), 303巻, 821頁(1983

年)〕。精製ヒトNGFのN末端アミノ酸配列を気相ブロテインシーケンサー(アプライドバイオシステム社モデル470A)を用いて決定した。その結果を表4に示す。

【0035】

表4 N末端アミノ酸配列

サイクル	PTH-アミノ酸		DNAより推定されるアミノ酸配列
	Residue	p mole	
1	Ser	605	Ser
2	Ser	495	Ser
3	Ser	384	Ser
4	His	785	His
5	Pro	705	Pro
6	Ile	767	Ile
7	Phe	829	Phe
8	His	341	His
9	Arg	700	Arg
10	Gly	425	Gly
11	Glu	478	Glu
12	Phe	517	Phe
13	Ser	97	Ser
14	Val	467	Val
15	—		Cys
16	Asp	297	Asp
17	Ser	58	Ser
18	Val	392	Val
19	Ser	73	Ser
20	Val	476	Val
21	Trp	95	Trp
22	—		Val
23	Gly	166	Gly
24	Asp	179	Asp
25	Lys	245	Lys

26	Thr	74	Thr
27	Thr	102	Thr
28	Ala	179	Ala

精製ヒトNGF 2.9 nmoleを分析に用いた。

【0036】ヒドラジン分解 (Natita ら、ジャーナル オブ バイオケミストリー (J. Biochem.), 59, 170 (1966)) で調べた精製ヒトNGFのC末端アミノ酸はアラニンであった。PAG等電点電気泳動法 (新版電気泳動実験法、電気泳動学会編、文光堂、1989年) で調べた結果、得られたヒトNGFの等電点はpH 9-10であり、マウスNGF (Collaborative Research Incorporated) のそれとほぼ同じであった。ブレイン リサーチ (Brain Research), 133, 350 (1977), エクスベリメンタル セル リサーチ (Experimental Cell Research), 145, 179 (1983) およびジャーナル オブ

ニューロサイエンス リサーチ (Journal of Neuroscience Research), 17, 25 (1987) に記載されている方法に従い、PC12細胞の神経突起の伸長 (neurite outgrowth) を指標にして、精製ヒトNGFの活性を測定したところ、精製ヒトNGFはマウス2.5S-NGFの標準品 (和光純薬) と同程度の活性を示した。ディベロブメンタル バイオロジー (Developmental Biology), 111, 62 (1985) に記載されている方法に従い、ニワトリ胚の脊髄後根神経節 (dorsal root ganglia; DRG) に対する精製ヒトNGFの作用を調べた。その結果、精製ヒトNGFは脊髄後根神経節 (DRG) 由来の神経細胞の神経突起の伸長および生存を促進した。

【0037】

参考例8 分子内ジスルフィド結合の解析

参考例7で得られた精製ヒトNGFを用いて、その分子内ジスルフィド結合の位置を決定した。凍結乾燥した精製ヒトNGF (530 µg) に0.2 mlの0.9% NaCl溶液と0.8 mlの0.01 M HClを加えて溶解した。*

配列-1

13 15 20
S-V-C-D-S-V-S-V

(配列表: 配列番号5)

配列-2

54 58 60 65
F-E-T-K-C-R-D-P-N-P-V-D-S-G-C-R-
70 73
G-I-D-S-

(配列表: 配列番号6)

配列-3

102 105 110 115
I-R-I-D-T-A-C-V-C-V-L-S-R-K-A-V-
120
R-R-A

(配列表: 配列番号7)

次に、このペプチド (2060 pmol) を減圧下に濃縮乾燥した後0.3 mlの50 mM酢酸ナトリウム (pH 6.0) に溶解した。この溶液に0.48 µg (14 pmol) のサーモライ

*この溶液のpHは2.2であった。これに重量比で1/50になるように、1 mg/mlのペプシン (Sigma社) 溶液を10.6 µl加えて、37℃で22時間反応させた。反応後950 µlを採取し、50 µlの250 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて反応を停止したものをペプシン消化物とした。ペプシン消化物をHPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。TSK-ゲルODS-120Tカラム (東ソー社、0.46×25 cm) を用いて、0.05% TFA (A) および99.95% アセトニトリル0.05% TFC (B) の混合物を以下の溶出プログラムに従って流した。流速は1 ml/min, 検出波長は220 nmおよび280 nm。

時間(分)	%A	%B
0	98	2
1	87	13
35	73	27
40	40	60

一方、ペプシン消化物50 µlに100 mM DTT溶液を10 µl加え、室温で3時間放置してジスルフィド結合を還元したサンプルを同じようにHPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。これら2つのペプチドマッピングを比較することにより、ジスルフィド結合を有するペプチドを固定した後、このペプチドを単離し、気相プロテインシーケンサー末端 (ABI社) アミノ酸配列を分析した。

【0038】その結果、本ペプチドは以下に示す配列-1、配列-2、および配列-3を含み、かつ3個のジスルフィド結合を持つ大きなペプチドであることがわかった。

シン (和光純薬工業(株)) を加えて、37℃で20時間反応させた後、上記と同一の条件下で、HPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。ただし、以下の溶出プロ

グラムを使用した。

時間(分)	%A	%B
0	100	0
1	97	3
25	82	18
30	60	40
31	100	0

さらに、ジスルフィド結合の位置を決定するために、上記ペプチドをDITで還元処理したサンプルを同じようにHPLCに付し、ペプチドマッピングを行った。ペプチドマッピングの比較から、ジスルフィド結合を含む3個のフラグメント(フラグメント-1、フラグメント-*

* 2、フラグメント-3)を固定し、それぞれ取得した。フラグメント-1、フラグメント-2、およびフラグメント-3のアミノ末端アミノ酸配列を分析した。その結果を表5に示す。一方、これらのフラグメントを過ギ酸で酸化し、システイン残基をシステイン酸に変換した後、アミノ酸分析を行った結果、いずれのフラグメントにも2残基ずつのシステイン酸が検出された。

【0039】

【表5】

サイ	フラグメント-1	フラグメント-2	フラグメント-3
検出された	検出された	検出された	検出された
アミノ酸(pmol)	アミノ酸(pmol)	アミノ酸(pmol)	アミノ酸(pmol)
1	Ser(60)	Phe(90)Ala(86)	Val(115)
2	Val(43)Tyr(43)	Glu(78)	Asp(70)
3	— —	Thr(45)	Ser(8)
4	Asp(43)Thr(28)	Lys(62)	Gly(47)
5	Ser(17)	—	—
6		Arg(78)	Arg(27)
7		Asp(49)	Gly(24)
8		Pro(33)	
9		Asn(31)	
10		Pro(11)	
構	S ¹¹⁵ -V-C ¹¹⁵ -D-S ¹¹⁷	F ⁸⁶ -E-T-K-C ⁸⁶ -R-D-P-N-P ⁸⁸	V ¹¹⁴ -D-S-G-C ¹¹⁴ -R-G ¹¹⁶
造	S ⁷⁰ -Y-C ⁸⁰ -T ⁸¹	A ¹⁰⁷ -C ¹⁰⁸	V ¹⁰⁹ -C ¹¹⁰

これらの結果から、精製ヒトNGFのジスルフィド結合の位置は、Cys¹¹⁵-Cys⁸⁰、Cys⁸⁶-Cys¹⁰⁸およびCys⁸⁶-Cys¹¹⁰であると結論された。このジスルフィド結合様式を〔図9〕に示す。また、ヒトNGFのアミノ酸を、配列表：配列番号9に示す。

【0040】

実施例1 抗ヒトNGFポリクローナル抗体の作製

参考例7で得られたヒトNGFをRibi Adjuvant (RIBI Immunochem. Res. Inc.)とよく混合し、その混合物をウサギ(ニュージーランドホワイト、体重約1.5kg、雌)の背部皮下に注射した。一匹当りのヒトNGF接種

量は100μgであった。以後10日毎に同量のヒトNGFとRibi Adjuvant(RIBI Immunochem. Res. Inc.)との混合物を同じウサギに5~7回注射した。上記のようにして免疫したウサギから採取して得られた血液を遠心分離し、抗血清を得た。得られた抗血清の抗体価をヒトNGFを抗原とするELISAで測定した結果、高い抗体価(8回; 16,000倍)が認められた。上記の抗血清をプロテインA-Sepharose カラム (Pharmacia Fine Chemicals Co., Ltd., Sweden 0.2M NaClを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)で平衡化したカラム(1ml)に血清を加え、同緩衝液で十分洗浄後、0.2Mを含

む1%酢酸で溶出した。)により精製し、抗ヒトNGF抗体IgG画分を得た。

【0041】

実施例2 EIA法を用いたヒトNGFの定量

96ウエルのポリスチレンマイクロタイタープレート(Falcon Co., Ltd., USA)に実施例1で得た100 µg/mlの抗ヒトNGF IgG画分を10 µlずつ分注し室温で2時間置き、IgG画分をマイクロタイタープレートに付着させた。このプレートを0.4M NaCl, 0.1% BSA, 0.1% NaN₃および1mM MgCl₂を含む0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.6)で、2回洗った後、同じbufferを加え(130 µl/ウエル)室温で2時間置いた。次にスタンダードヒトNGFを含む液20 µlを加え、室温で4時間ゆっくり振盪した後上記bufferで2回洗浄した。洗浄後、ビオチンラベルした抗ヒトNGF IgG液(35 ng/ml)を30 µl/ウエル加え、一晚4℃で振盪し、上記bufferで2回洗浄した。抗ヒトNGF IgG画分のビオチンラベルは HSU, S.-M., Raine, L. and Faugen, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody(PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29(4), 577-580(1981)の方法を用いた。次に30 µlのストレプトアビシン-β-D-ガラクトシダーゼ complex を加え1時間室温で振盪した後、上記bufferで3回洗浄した。このプレートに60mMの4-methylumbelliferyl-β-D-ガラクトシダーゼを30 µl加え室温で4時間インキュベートし、130 µlの0.1M glycine-NaOH buffer(pH 10.3)を加えて反応を停止させた後、Fluorometryにより蛍光強度(Excitation 360 nm; Emission 450 nm)を測定した。参考例7で得られたヒトNGFを用いてこのEIAを行って得た標準曲線は図10に示すようになった。この曲線から本EIAは下限1Pg/20 µl/well程度迄のヒトNGFを検出できることがわかった。

配列:

```

CCCCGGTTAC GCCTGTTGTC CCGGTATAAC CAT
TGCTAGC ACACCCCTTTC CCTCTCAGAA 60
GTGCCCCGGT TTGAATGAAA CCTCTTCGTG ATC
CCCTTGG GAGGTCAACT CTGAGGGACC 120
CAGAAACTGC CTTTGTACTG CATTAGTAC TCC
ATGAAGT CACCCTCATT TCTTTTTCAT 180
TCCAGGTGCA TAGCGTA ATG TCC ATG TTG T
TC TAC ACT TCG ATC ACA GCT 230
Met Ser Met Leu P
he Tyr Thr Leu Ile Thr Ala
1
5 10
TTT CTG ATC GGC ATA CAG GCG GAA CCA
CAC TCA GAG AGC AAT GTC CCT 278

```

【0042】

実施例3 種々の動物由来NGFの抗原性の比較

実施例2に示された抗ヒトNGF IgG画分を用いたEIA法により、種々の動物由来NGFの抗原性を比較検討した。すなわち、実施例2と同一方法を用い、種々のNGFの標準曲線を求め、図11に示した。図11から、ウシ、モルモット、マウス、ヘビ由来NGFの順に免疫交差性が低下することが分かった。図11は、実施例2で得られた本発明の抗ヒトNGFポリクローナル抗体を用いたEIAによる種々のNGFの標準曲線を示す。図11において—●—はヒトNGFの、—○—はウシNGFの、—△—を黒くぬった印はモルモットNGFの、—△—はマウスNGFの、—□—を黒くぬった印はヘビ(コブラ)毒NGFの結果をそれぞれ示す。

【0043】

【発明の効果】本発明ではヒトNGFを抗原として用いた抗体を得るが、ヒトNGF全蛋白質であるためこのポリクローナル抗体は多くのエピトープを認識する多種の抗体の混合物として得られる。従って本発明のヒトNGFの検出・測定法によると、微量のNGFを高感度で測定することができるので、ヒトの体液や組織中のNGFを有利に検出・測定することができ、また疾病の診断法としても用いることができる。

【0044】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 972

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

生物名: ヒト

株名: 組織

Phe	Leu	Ile	Gly	Ile	Gln	Ala	Glu	Pro	
His	Ser	Glu	Ser	Asn	Val	Pro			
			15					20	
				25					
GCA	GGA	CAC	ACC	ATC	CCC	CAA	GTC	CAC	
TGG	ACT	AAA	CTT	CAG	CAT	TCC		326	
Ala	Gly	His	Thr	Ile	Pro	Gln	Val	His	
Trp	Thr	Lys	Leu	Gln	His	Ser			
		30					35		
			40						
CTT	GAC	ACT	GCC	CTT	CGC	AGA	GCC	CGC	
AGC	GCC	CCG	GCA	GCG	GCG	TAT		374	
Leu	Asp	Thr	Ala	Leu	Arg	Arg	Ala	Arg	
Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ile			
	45					50			
		55							
GCT	GCA	CGC	GTG	GCG	GGG	CAG	ACC	CGC	
AAC	ATT	ACT	GTG	GAC	CCC	AGG		422	
Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Gly	Gln	Thr	Arg	
Asn	Ile	Thr	Val	Asp	Pro	Arg			
60					65				
	70					75			
CTG	TTT	AAA	AAG	CGG	CGA	CTC	CGT	TCA	
CCC	CGT	GTG	CTG	TTT	AGC	ACC		470	
Leu	Phe	Lys	Lys	Arg	Arg	Leu	Arg	Ser	
Pro	Arg	Val	Leu	Phe	Ser	Thr			
			80						
	85				90				
CAG	CCT	CCC	CGT	GAA	GCT	GCA	GAC	ACT	
CAG	GAT	CTG	GAC	TTC	GAG	GTC		518	
Gln	Pro	Pro	Arg	Glu	Ala	Ala	Asp	Thr	
Gln	Asp	Leu	Asp	Phe	Glu	Val			
			95					100	
			105						
GGT	GGT	GCT	GCC	CCC	TTC	AAC	AGG	ACT	
CAC	AGG	AGC	AAG	CGG	TCA	TCA		566	
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Phe	Asn	Arg	Thr	
His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Ser			
		110					115		
			120						
TCC	CAT	CCC	ATC	TTC	CAC	AGG	GGC	GAA	
TTC	TCG	GTG	TGT	GAC	AGT	GTC		614	
Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	
Phe	Ser	Val	Cys	Asp	Ser	Val			
	125					130			
		135							
AGC	GTG	TGG	GTT	GGG	GAT	AAG	ACC	ACC	
GCC	ACA	GAC	ATC	AAG	GGC	AAG		662	
Ser	Val	Trp	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Thr	
Ala	Thr	Asp	Ile	Lys	Gly	Lys			

```

140                      145
      150                      155
GAG GTG ATG GTG TTG GGA GAG GTG AAC
ATT AAC AAC AGT GTA TTC AAA      710
Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn
Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys
      160
165                      170
CAG TAG TTT TTT GAG ACC AAG TGC CGG
GAC CCA AAT CCC GTT GAC AGC      758
Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg
Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser
      175                      180
                      185
GGG TGC CGG GGC ATT GAC TCA AAG CAC
TGG AAC TCA TAT TGT ACC ACG      806
Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His
Trp Asn Ser Ty
      190
      195                      200
ACT CAC ACC TTT GTC AAG GCG CTG ACC
ATG GAT GGC AAG CAG GCT GCC      854
Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr
Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala
      205                      210
      215
TGG CGG TTT ATC CGG ATA GAT ACG GCC
TGT GTG TGT GTG CTC AGC AGG      902
Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala
Cys Val Cys Val Leu Ser Arg
      220                      225
      230                      235
AAG GCT GTG AGA AGA GCC TGACCTGCCG A
CACGCTCCC TCCCCCTGCC      950
Lys Ala Val Arg Arg Ala
      240
CCTTCTACAC TCTCCTGGGC CC

```

972

【0045】配列番号：2

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：アダプター

*

配列：

```

AGCTTGCCGC CACCATGTCC ATGTTGTTCT ACA
CTCT

```

37

【0046】配列番号：3

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：アダプター

配列：

```

GATCAGAGTG TAGAACAACA TGGACATGGT GCGGGCCA

```

37

【0047】配列番号：4

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：アダプター

*

配列：

CAGATCTGGG CC

12

【0048】配列番号：5

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val

5

【0049】配列番号：6

※

配列：

Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys

5

10

15

Arg Gly Ile Asp Ser

20

【0050】配列番号：7

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★

配列：

Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Arg

5

10

15

Val Arg Arg Ala

【0051】配列番号：8

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

☆

配列：

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys

5

10

15

【0052】配列番号：9

配列の長さ：120

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp

5

10

15

Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys

20

25

30

Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val

35

40

45

Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val

50

55

60

Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys

65

70

75

80

Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln

85

90

95

Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu

100 105 110
 Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
 115 120

【図面の簡単な説明】

【図1】は、参考例1で得られたクローン化したヒトNGF遺伝子の塩基配列およびこれから翻訳されるアミノ酸配列を示す。

【図2】は、参考例1で得られたクローン化したヒトNGF遺伝子の塩基配列およびこれから翻訳されるアミノ酸配列を示す。

【図3】は、参考例1で得られたクローン化したヒトNGF遺伝子の塩基配列およびこれから翻訳されるアミノ酸配列を示す。

【図4】は、参考例1で得られた、ヒトNGF発現ベクターpMNGF101の構築図を示す。

【図5】は、参考例2で得られた、ヒトNGF発現ベクターpMNGF201の構築図を示す。

【図6】は、参考例2で得られた、ヒトNGF発現ベクターpMNGF201の構築図を示す。

【図7】は、参考例3で得られた、ヒトNGF発現ベクターpTB1058の構築図を示す。

【図8】は、参考例3で得られた、ヒトNGF発現ベクターpTB1058の構築図を示す。

【図9】は、参考例8で得られた、精製ヒトNGFのジスルフィド結合様式の解析図を示す。

【図10】は、実施例2で得られた、本発明の抗ヒトNGFポリクローナル抗体を用いたヒトNGFのEIAの標準曲線を示す。

【図11】は、実施例3で得られた、種々のNGFの標準曲線を示す。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	Z N A	H 8214-4B		
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.